



# Etude des mécanismes extracellulaires régulant la fonction du récepteur MerTK au cours de la phagocytose rétinienne

Célia Parinot

## ► To cite this version:

Célia Parinot. Etude des mécanismes extracellulaires régulant la fonction du récepteur MerTK au cours de la phagocytose rétinienne. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066319 . tel-01371127

**HAL Id: tel-01371127**

**<https://theses.hal.science/tel-01371127>**

Submitted on 24 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Institut de la Vision

**Etude des mécanismes extracellulaires  
régulant la fonction du récepteur MerTK  
au cours de la phagocytose rétinienne**

Présentée par :

Célia Parinot

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie

Présentée et soutenue publiquement le 22 Septembre 2015

Devant un jury composé de :

Pr Michel Paques

Président du jury

Dr Florence Niedergang

Rapportrice

Dr Olaf Strauss

Rapporteur

Dr Gaël Orioux

Examineur

Dr Omar Benzakour

Examineur

Dr Emeline Nandrot

Directrice de thèse

*“En essayant continuellement on finit par réussir. Donc :  
plus ça rate, plus on a de chance que ça marche.”*

Les Shadoks,  
Jacques Rouxel

# REMERCIEMENTS

Je remercie le Pr José-Alain Sahel de m'avoir accueilli au sein de l'Institut de la Vision et de faire de cet institut un lieu convivial où la recherche est de qualité.

Je remercie également tous les membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Particulièrement aux rapporteurs : Dr Olaf Strauss d'avoir accepté de lire et corriger une thèse en français, et au Dr Florence Niedergang d'avoir accepté de suivre mon projet. Je souhaite également remercier les examinateurs, le Dr Omar Benzakour, pour votre « oui » sans hésitation et de venir jusqu'à Paris, et le Dr Gaël Orioux, professeur et maintenant examinateur ; merci pour tes nombreux conseils tout au long de mon parcours universitaire, et enfin merci au Dr Michel Paques de me faire l'honneur de présider ce jury.

Et bien sûr un grand merci à toi Emeline, pour m'avoir accueillie dans ton équipe, et de m'avoir confiée ce projet si intéressant. Grâce à toi, le western-blot n'a plus de secret pour moi maintenant ! Tu m'as fait découvrir la science et transmis ta passion pour la recherche. Tu m'as fait confiance, et permis de défendre le projet à de nombreux congrès internationaux. Merci aussi pour les nombreuses relectures du manuscrit. Merci pour tout !

Je tiens également à remercier Sanofi pour son soutien financier à la réalisation de mon projet de Doctorat.

Comme un Doctorat ne se fait pas toute seule, je veux remercier toutes les personnes avec qui j'ai pu échanger dans ce labo et en dehors, et qui m'ont permis d'être là où je suis maintenant, alors ces quelques pages sont pour vous dire à quel point vous comptez pour moi. Vous le savez, je suis bavarde alors prenez votre mal en patience !

Je voudrais remercier toutes les personnes de mon équipe parties ou encore présentes pour votre soutien inconditionnel, votre aide dans les manip, les coups durs, les soirées au gamin... Une équipe exceptionnelle ! **Ah-Lai** merci pour les leçons d'anglais. **Débo**, merci pour les fou-rires, ton insouciance et tes punchlines inoubliables tu as apporté beaucoup de folies à cette équipe ! **Dorine** a repris un peu la suite mais à un niveau en dessous quand même. Merci pour cette bonne humeur. **QRU-QRU** un immense merci pour tout ! Tu es un collègue génial, sans toi ça n'aurait pas été pareil. Toutefois, je suis désolée pour toutes ces conversations féminines mais maintenant tu es incollable sur la pose de vernis (même plus doué que moi !). Merci également aux post-doc **Ludovic** et **Eglantine** qui m'avez toujours encouragé. Et enfin la petite dernière **Nawel**, on pensait que tu serais une sainte mais erreur fatale ! Merci aussi à **Sarah**, j'ai été ravie de t'encadrer, toujours motivée et très agréable.

Je souhaite remercier les personnes qui m'ont supporté au quotidien dans mon bureau. Un immense merci à **Adeline** et **Ophélie**, vous m'avez montré le chemin. Merci pour toutes les discussions et les pétages de plomb le vendredi soir ! Depuis votre départ le bureau est devenu bien plus masculin ! Merci à vous aussi **Hugo** et **Arthur**, même si vous avez envahi

ce bureau, j'ai été contente de le partager avec vous. Enfin pour terminer le tour de ce bureau, merci **Ying** pour ta gentillesse et les belles orchidées dans le bureau.

Passons au bureau d'à côté. Les chefs ! Merci à vous aussi. Merci **Alvaro** pour votre bonne humeur, vous êtes et resterez notre émérite préféré ! Et merci à **Florian** et **Xavier** pour les nombreux conseils très utiles et les petites discussions ! **Xavier**, grâce à toi j'ai pu découvrir Hawaï sereinement, merci !

Merci également aux autres doctorants du bureau d'à côté (**Georges, Anaïs, Pierre, Moukri, Shulong**) ! Soutien soutien !!

Et enfin pour clore le tour du 3ème étage de l'institut je remercie la petite **Céline**, (non non ne me pète pas les genoux), **Anne-Laure** pour avoir gardé mon petit chat et pour ton soutien et ma m..... du labo, pardon **Luisa** !! Tu m'as remonté le moral maintes fois, tu m'as épaulé, rassuré, conseillé, pas sur d'avoir tenu sans toi ! Mille mercis. Merci aussi à **Martine** pour ces petites discussions dans le couloir !

Il y a aussi le 4ème que j'ai réussi à infiltrer et que je voudrais remercier. **Morgane** pour les pauses clopes, les bars, la cantine et ta générosité, **François** pour le chocolat, l'ISH et ta gentillesse et **Antoine**, mes 3 acolytes du midi qui m'ont permis de m'évader un peu avant la fin. **Antoine**, mille mercis, grâce à toi la fin de la thèse s'est déroulée sans trop de stress, je te suis énormément reconnaissante. Enfin **Chloé**, parce que tu es toi ! Merci aussi à **Sandrine** et **Caroline** qui m'ont beaucoup aidé vers la fin pour apprivoiser l'ISH. Petite note pour **Angélique** : ca y est c'est bon c'est fait : écrit, imprimé, relu, recorrecté, et soutenue !! Merci pour ce soutien à la fin, copine d'écriture, de stress, de bibliothèque et de bonheur ! Merci aussi aux autres personnes du 4<sup>ème</sup> (**Marion, Elise, Christelle, Emma, Géraldine, Yvrick...**).

Je voudrais faire un petit clin d'œil aux anciens collègues que je vois toujours **Laëtitia, Amandine**, la petite **Céline, Antoine** et celle dont on ne doit pas prononcer le nom qui se reconnaîtra en tant que **l'Otarie**. Et merci aussi à l'autre **Céline**, courage pour la suite de tes cours ! Ne lâche rien.

Enfin je voudrais remercier tous ceux avec qui j'ai pu discuter travail ou non à l'institut, et qui ont contribué à faire de ces 4 années de thèse une expérience inoubliable ! Merci à vous tous !

Je tiens également à remercier ma famille, qui me soutient depuis toujours dans la réalisation de tous mes projets, professionnels et personnels. Merci à mes parents, mon frère, mes tantes et mes grands-parents qui ont toujours tenu à comprendre ce que je fais ! Merci de votre soutien inconditionnel ! Grâce à vous je me dis que tout est possible ! Merci également à ma belle-famille, **Marina, Ulisse** et **Isabelle**, pour tous les moments de partage, les bons petits plats et cette belle langue qu'est l'italien ! Je remercie aussi mon petit chat **Lampo**, le seul à m'attendre tous les soirs, à me faire la fête et à ne rien me demander à part de lui donner à manger et des heures de câlin !

Je veux également remercier mes amis : sissi la famille !!!! **Tristan, Emilie, Juliette, Clément, Rouguy, Maria et Toto**. Nous nous sommes soutenus pendant la fac et nos futurs projets que ce soit pour la thèse ou autre. Je sais que je pourrais toujours compter sur vous et vice-versa, merci. **Tristan**, bon courage pour ta soutenance qui arrive prochainement. Merci aussi à **Touf et Laura**, les premiers de la promo à être Docteur ! Petite Laura, la première à partir s'expatrier, tu me manques ! Touf ta passion pour les insectes nous fait rêver, ne change rien ! Merci pour ta maison au Puech Pallat, que du bonheur ! Et aussi tous les BIP (**Isa, Nico, Basile, Manale, Quentin, Samuel, Renaud, Marion, Vincent, Garth, Romain...**). Nous avons commencé ensemble et nous finissons ensemble ! Merci pour votre soutien, votre amitié. Je suis heureuse de faire partie de cette bande de gai luron ! Avec vous tous les soucis sont partis ! Une petite pensée pour Tristan, on sera Docteur le même jour ! Surtout merci à **Renaud** pour cette maison à Videlles qui nous réunit tous !

Je remercie également les grimpeurs ! Mon bol d'air frais. La découverte de la falaise et de ce sport où il faut encore se battre mais qui nous donne un sentiment de liberté ! Nous avons passé tant d'heures sur ce mur à Milliat ! Vous m'avez tous poussé dans mes retranchements, allez allez toujours plus haut ! Merci à **Chouchou** (Sam) pour ma première grande voie et ma première course d'alpi, toujours rassurant ! Merci à **Arthur** avec qui j'ai partagé une grande voie magnifique et qui m'a prouvé qu'une 6b en falaise est faisable ... Merci à **Rémi** d'avoir autant de patience et merci à **Maud et Romain** pour me motiver « allez c'est pas si dur tu fais comme ci comme ça et ça passe » (pas toujours !). Merci **Romu** pour toutes les séances de grimpe et de courses, grâce à toi la course est devenue un plaisir ! Et aussi tous les autres : **Momo** (le fou), **Patricia, Lucie, Renan** (le clown), **Tom-Tom, Nicole, Sandro** (ahhh, cette rando à ski !), **Laëtitia, Goki...**

Merci aussi à mes amis de médecine : **Noëlle, Flo, Duy, Alex et Maxime, P-E, Nico et Pauline**. Merci pour tous ces repas partagés. A quand et chez qui le prochain ? Difficile de vous voir les filles pourtant à chaque fois c'est un réel bonheur !

Le dernier mot est pour toi **Vasco**. Merci de me supporter au quotidien, d'avoir la patience de m'attendre, de me faire des bons petits plats, de me laisser autant de liberté, et de me motiver dans tout ce que j'entreprends ! Tu me donnes la force de continuer ! C'est bon la thèse c'est finie, maintenant je me consacre à nous et j'espère pouvoir partager encore de nombreux moments agréables avec toi.

Voilà la thèse est finie. Au final ce n'est pas si terrible lorsqu'on a la chance d'être si bien entouré par sa famille, ses amis et ses collègues. Un immense MERCI !

## RESUME

Le récepteur MerTK est impliqué dans la phagocytose des segments externes des photorécepteurs (SEP) par l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), une fonction cruciale pour la survie des photorécepteurs et la vision. Dans la rétine, le contact est permanent entre les SEP et l'EPR alors que la phagocytose ne survient qu'à un moment précis. L'activation de ce processus doit donc être précisément contrôlée pour déclencher la phagocytose au moment opportun et la limiter dans le temps. Le pic de phagocytose est lié à l'activation intracellulaire de MerTK via le couple récepteur–ligand intégrine  $\alpha\text{v}\beta 5$ –MFG-E8. Ce projet a eu pour but d'étudier les mécanismes extracellulaires régulant la fonction du récepteur MerTK au cours de la phagocytose rétinienne.

Tout d'abord, nous avons montré que MerTK est clivé de la surface des cellules d'EPR *in vitro* et *in vivo* avant et après le pic de phagocytose. Ceci permettrait de limiter la durée du pic de phagocytose et d'éviter ainsi une phagocytose trop prononcée des SEP par l'EPR. Nous avons montré le rôle opposé des deux ligands de MerTK, Gas6 et Protéine S. Gas6 semble agir comme inhibiteur car il stimule le clivage de MerTK et diminue la phagocytose *in vitro*. De plus, son expression *in vivo* est faible au moment du pic de phagocytose. Au contraire Protéine S, dont l'expression augmente *in vivo* au moment du pic de phagocytose, inhibe le clivage de MerTK et stimule la phagocytose *in vitro*, ce qui pourrait ainsi potentialiser cette fonction. De plus, nos données sur les sites de liaison des ligands sur MerTK tendent à montrer que Gas6 et Protéine S reconnaissent des acides aminés différents, ce qui pourrait conduire à des changements conformationnels du récepteur et expliquer leurs rôles différents.

Ensuite, nous avons étudié plusieurs protéases candidates pour ce clivage : ADAM9, 10, 17 et HtrA1. Nous avons démontré que l'inhibition d'ADAM17 *in vitro* engendre une diminution du clivage de MerTK corrélée à une augmentation de récepteur MerTK disponible à la surface cellulaire. De plus, en absence d'ADAM17, la quantité de MerTK activé est plus importante. Cependant, MerTK est toujours clivé quand ADAM17 est inhibée, nous ne pouvons donc pas exclure l'implication d'autres protéases dans le clivage de MerTK. En effet, ADAM9 et 10 sont capables de cliver MerTK *in vitro*, et l'inhibition d'ADAM10 diminue le clivage de MerTK dans les cellules RPE-J.

Ainsi, mes travaux de Doctorat permettent de mieux comprendre la régulation complexe de l'activité de MerTK dans la phagocytose rétinienne, faisant intervenir de nombreuses molécules essentielles pour le rythme circadien de cette fonction.

**Mots- clés : épithélium pigmentaire rétinien, phagocytose rythmique, MerTK, Gas6, Protéine S, ADAM**

# ABSTRACT

The MerTK receptor is involved in the daily phagocytosis of photoreceptor outer segments (POS) by the retinal pigment epithelium (RPE), an indispensable process for photoreceptors survival and vision. In the retina, the contact between POS and RPE is permanent, and POS phagocytosis occurs at a specific time. Thus, activation of this process must be tightly regulated in order to trigger and limit phagocytosis duration. The phagocytic peak is initiated by the intracellular activation of MerTK via the  $\alpha v \beta 5$  integrin receptor and its ligand MFG-E8. This project aimed at studying the extracellular mechanisms that control MerTK function during POS phagocytosis.

First, we have shown that MerTK can be cleaved from the surface of RPE cell *in vitro* and *in vivo* before and just after the phagocytosis peak. This process might limit the duration of the phagocytic peak and thus avoid prolonged POS phagocytosis. In one part of the project, we have shown the opposite role of MerTK ligands Gas6 and Protein S during retinal phagocytosis. Gas6 appears to inhibit phagocytosis and stimulate MerTK cleavage *in vitro*. In addition, Gas6 expression *in vivo* is weak at peak phagocytosis time. In contrast, Protein S, which expression increases at the phagocytic peak *in vivo*, inhibits MerTK cleavage and stimulates POS phagocytosis *in vitro*, and thus might potentiate the phagocytic activity. Moreover, our analysis of the ligand binding sites on MerTK extracellular domain suggests that Gas6 and Protein S recognize slightly different amino acids and might therefore lead to conformational changes of the receptor, therefore explaining the difference we observed in the roles they play.

Second, we studied several protease candidates for this cleavage: ADAM9, 10 and 17 and HtrA1. We have demonstrated that *in vitro* inhibition of ADAM17 resulted in decreased MerTK cleavage associated with increased numbers of full-length receptors available at the cell surface and of activated MerTK receptors. However, as cleavage of MerTK still occurs when ADAM17 is inhibited, we cannot exclude the implication of another protease in the regulation of this process. Indeed, ADAM9 and 10 can cleave MerTK *in vitro*, and inhibition of ADAM10 results in a decrease of MerTK cleavage in RPE-J cells.

Taken together, my PhD data allows us to better understand the complex regulation of MerTK activity during retinal phagocytosis, which implicates many essential molecules for the circadian rhythm of this function.

**Keywords: retinal pigment epithelium, rhythmic phagocytosis, MerTK, Gas6, Protein S, ADAM**



# LISTES DES PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS EN LIEN AVEC LE TRAVAIL DE THESE

## Articles dans revues à comité de lecture :

**Parinot C\***, Law A-L\*, Chatagnon J, Gravez B, Sahel J-A, Bhattacharya SS and Nandrot EF (2015). Cleavage of MerTK from the RPE cell surface helps regulate the binding step of POS phagocytosis. *Journal of Biological Chemistry* 290(8): 4941-4952. (\* co-premiers auteurs).

**Parinot C**, Rieu Q, Chatagnon J, Finnemann SC and Nandrot EF (2014). Large-scale purification of photoreceptor outer segments for phagocytosis assays on retinal pigment epithelial cells. *Journal of Visualized Experiments* (94): e52100.

**Parinot C**, Chatagnon J, Rieu Q, Neel D, Nandrot EF (2015). Differential expression and binding for MerTK ligands Gas6 and Protein S during retinal phagocytosis. *Journal of the European Molecular Biology Organization* (en soumission).

## Chapitres de livres :

**Parinot C** and Nandrot EF (2015). A comprehensive review of mutations in the MERTK proto-oncogene. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 854, "Retinal Degenerative Diseases", C. Bowes Rickman et al. Eds. Springer International Publishing Switzerland (in press).

**Parinot C**, Nandrot EF (2012). Fonctions de l'épithélium pigmentaire rétinien. Analogies avec l'épiderme. In : *Biologie cutanée*, Co BIP 2012, éditions Matrix, édité par Marek Haftek, p. 69-84.

## Communications orales :

**Parinot C**, Chatagnon J, Nandrot EF (2013). International scientific meeting *ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology)*. Investigation of protease candidates for the release of soluble MerTK during photoreceptor outer segments phagocytosis by retinal pigment epithelium.

**Parinot C**, Chatagnon J, Nandrot EF (2014). International scientific meeting *ISER (International Society for Eye Research)*. Multiple pathways for the circadian regulation of the retinal phagocytosis receptor MerTK.

# SOMMAIRE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>REMERCIEMENTS.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>RESUME .....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>LISTES DES PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS EN LIEN AVEC LE TRAVAIL DE THESE.....</b>                          | <b>7</b>  |
| <b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>LISTE DES ANNEXES .....</b>   | <b>14</b> |
| <b>AVANT-PROPOS .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>INTRODUCTION .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>I. Le système visuel.....</b>   | <b>17</b> |
| 1. Présentation de l'œil.....  | 17        |
| 2. La rétine .....   | 18        |
| a) Organisation stratifiée de la rétine .....  | 18        |
| b) Le système vasculaire rétinien .....  | 21        |
| c) Les barrières hémato-rétiniennes .....  | 21        |
| 3. Les photorécepteurs .....   | 23        |
| a) Organisation cellulaire .....   | 23        |
| b) Fonction visuelle .....   | 25        |
| 4. L'épithélium pigmentaire rétinien .....   | 27        |
| a) Organisation cellulaire .....   | 27        |
| b) Fonctions biologiques de l'épithélium pigmentaire rétinien.....   | 28        |
| c) Les pathologies associées à des défauts fonctionnels de l'épithélium pigmentaire rétinien .....             | 34        |
| <b>II. La phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien.....</b> | <b>37</b> |
| 1. La machinerie de la phagocytose : analogie avec les macrophages .....                                       | 37        |
| a) La phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages .....   | 37        |
| b) La phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien .....        | 38        |
| 2. Le rôle de l'intégrine $\alpha v \beta 5$ dans la phagocytose rétinienne.....                               | 40        |
| a) Rôle dans la liaison des segments externes et dans la rythmicité .....                                      | 40        |
| b) Signalisation intracellulaire de l'intégrine $\alpha v \beta 5$ .....                                       | 41        |
| 3. L'identification de MerTK : un modèle historique, le rat RCS .....  | 44        |
| <b>III. Le récepteur Mer Tyrosine Kinase (MerTK).....</b>  | <b>46</b> |
| 1. Un récepteur de la famille TAM .....  | 46        |
| a) Nomenclature, structure et expression .....   | 46        |
| b) Activation et fonctions cellulaires.....  | 48        |
| 2. Mutations du gène <i>MERTK</i> et pathologies associées.....  | 50        |
| 3. Activation rythmique et cascade de signalisation .....  | 51        |
| 4. Régulation extracellulaire de la fonction de MerTK .....  | 53        |

|  |            |
|--|------------|
| a) Par ses ligands Gas6 et Protéine S .....  | 53         |
| b) Par le clivage de son ectodomaine .....   | 55         |
| <b>IV. Les ligands de la matrice interphotorécepteurs .....</b>                              | <b>57</b>  |
| 1. Protéine S et Gas6 .....  | 57         |
| a) Structure et expression .....   | 57         |
| b) Régulation post-traductionnelle nécessaire à leur fonction .....                          | 58         |
| c) Rôle de la Protéine S dans la coagulation sanguine .....                                  | 58         |
| d) Rôles de Protéine S et de Gas6 avec les récepteurs TAM .....                              | 59         |
| 2. MFG-E8 .....  | 62         |
| a) Structure et expression .....   | 62         |
| b) Fonctions cellulaires .....   | 63         |
| <b>V. Les protéases de la famille ADAM .....</b>   | <b>65</b>  |
| 1. Vue d'ensemble de cette grande famille .....  | 65         |
| a) Domaines protéiques des ADAM .....  | 65         |
| b) Lieux d'action et expression cellulaire .....   | 68         |
| 2. Activités protéolytiques des ADAM .....   | 69         |
| a) ADAM9 .....   | 69         |
| b) ADAM10 .....  | 70         |
| c) ADAM17 : une enzyme versatile .....   | 71         |
| 3. Régulation de l'activité des ADAM .....   | 72         |
| <b>PROJET DE THESE .....</b>   | <b>73</b>  |
| <b>RESULTATS .....</b>   | <b>75</b>  |
| <b>I. Le clivage de MerTK .....</b>  | <b>75</b>  |
| 1. Introduction .....  | 75         |
| 2. Résultats .....   | 75         |
| 3. Discussion .....  | 89         |
| <b>II. Régulation de MerTK via ses ligands .....</b>   | <b>90</b>  |
| 1. Introduction .....  | 90         |
| 2. Résultats .....   | 90         |
| 3. Discussion .....  | 120        |
| <b>III. Identification de la protéase responsable du clivage de MerTK .....</b>              | <b>121</b> |
| 1. Introduction : choix des candidats .....  | 121        |
| 2. Matériels et méthodes .....   | 122        |
| 3. Résultats .....   | 126        |
| a) L'expression de ces protéases varie au cours de la journée .....                          | 126        |
| b) Certaines protéases colocalisent avec MerTK au cours de la phagocytose <i>in vitro</i> .. | 131        |
| c) ADAM9, 10 et 17 clivent MerTK <i>in vitro</i> .....                                       | 133        |
| d) L'inhibition d'ADAM17 augmente l'activation de MerTK et diminue son clivage ..            | 134        |
| 4. Discussion .....  | 138        |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....</b>  | <b>140</b> |
| <b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>   | <b>151</b> |
| <b>ANNEXES .....</b>   | <b>167</b> |

# LISTE DES ABREVIATIONS

## A

A2E : di-rétinoïde-pyridinium-éthanolamine

ADAM : a disintegrin and metalloprotease

APP : précurseur de l'amyloïde beta

AQP1 : aquaporine-1

## B

BHR : barrière hémato-rétinienne

BSA : bovine serum albumin

## C

C4b-BP : C4b-binding protein

CML : cellule musculaire lisse

## D

DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge

## E

EEA1 : early endosomal antigen 1

EGF : epidermal growth factor

EPR : épithélium pigmentaire rétinien

ERG : électrorétinogramme

## F

FAK : focal adhesion kinase

FcγR : récepteur Fcγ

FITC : fluorescein isothiocyanate

FPS III : Fluorogenic Peptide Substrate III

## G

Gas6 : growth arrest-specific 6

GMPc : GMP cyclique

GRB : growth factor receptor-bound proteins

## H

HtrA1 : high-temperature requirement factor A1

## I

IB : immunoblot

IF : immunofluorescence

IL-6 : interleukine 6

IRBP : interphotoreceptor retinoid-binding protein

## **K**

kb : kilobase

kDa : kiloDalton

## **L**

LDL : lipoprotéines de faible densité

LPS : lipopolysaccharides

## **M**

Mer<sup>kd</sup> : Mer kinase dead

MerTK : Mer tyrosine kinase

MFG-E8 : milk fat globule-EGF factor 8

MFG-E8c : forme courte de MFG-E8

MFG-E8L : forme longue de MFG-E8

MIP : matrice interphotorécepteurs

MMP : matrix metalloproteases

## **N**

NMMII : myosine non musculaire de type II

## **P**

PDE : phosphodiesterase

PEDF : pigment epithelium-derived factor

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PIP2 : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

PIP3 : phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate

PKC : protéine kinase C

PKVD : protéines dépendantes de la vitamine K

PtdSer : phosphatidylsérine

## **R**

RGD : arginine-glycine-asparagine

RP: rétinite pigmentaire

RPE65: retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa

## **S**

sAxl: Axl soluble

SEP : segments externes des photorécepteurs

SH2: Src Homology 2

SHBG : sex-hormon-binding globulin

sMerTK : MerTK soluble

SOCS : suppressor of cytokine signaling

SSC : standard saline citrate

## **T**

TACE : TNF- $\alpha$  converting enzyme

TAM (récepteurs) : récepteurs Tyro3, Axl, MerTK

TAPI-0 : TNF- $\alpha$  protease inhibitor-0

TBS : tris buffered solution

TIM : T cell immunoglobulin and mucin domain

TIMP : tissue inhibitors of metalloproteinases

TLR : Toll like receptor

TNF- $\alpha$  : tumor necrosis factor- $\alpha$

## **V**

VEGF : vascular endothelium growth factor

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

|  |     |
|--|-----|
| Figure 1 : Représentation schématique d'un œil humain.....   | 17  |
| Figure 2 : Organisation stratifiée de la rétine.....   | 20  |
| Figure 3 : Schémas des réseaux vasculaires de la rétine.....   | 22  |
| Figure 4 : Représentation schématique des deux types de photorécepteurs.....   | 24  |
| Figure 5 : Molécules impliquées dans la cascade de phototransduction.....  | 26  |
| Figure 6 : L'épithélium pigmentaire rétinien est en contact étroit avec les photorécepteurs.....                         | 28  |
| Figure 7 : Les fonctions de l'épithélium pigmentaire rétinien.....   | 29  |
| Figure 8 : Mise en évidence du renouvellement des SEP et de la phagocytose rétinienne.....                               | 31  |
| Figure 9 : La phagocytose rétinienne présente un rythme circadien.....   | 33  |
| Figure 10 : Les acteurs de la phagocytose rétinienne.....  | 44  |
| Figure 11 : Schéma de la structure du récepteur MerTK.....   | 47  |
| Figure 12 : Schéma de la structure de Protéine S et de Gas6.....   | 58  |
| Figure 13 : Schéma de la structure de MFG-E8.....  | 64  |
| Figure 14 : Schéma de la structure des ADAM.....   | 66  |
| Figure 15 : Les protéases HtrA1, ADAM9, 10 et 17 sont exprimées par la rétine et l'EPR.....                              | 127 |
| Figure 16 : Analyse de l'expression de HtrA1 dans la rétine de souris.....   | 128 |
| Figure 17 : Analyse de l'expression d'ADAM9 dans la rétine de souris.....  | 129 |
| Figure 18 : Analyse de l'expression d'ADAM10 dans la rétine de souris.....   | 130 |
| Figure 19 : Analyse de l'expression d'ADAM17 dans la rétine de souris.....   | 131 |
| Figure 20 : ADAM9, 10, 17 et HtrA1 sont localisées au niveau des SEP au cours de la<br>phagocytose <i>in vitro</i> ..... | 132 |
| Figure 21 : Les ligands solubles jouent un rôle sur le clivage de MerTK par ADAM9, 10 et 17<br><i>in vitro</i> .....     | 133 |
| Figure 22 : L'inhibition d'ADAM17 augmente la capacité phagocytaire des cellules RPE-J....                               | 135 |
| Figure 23 : L'inhibition d'ADAM10 et 17 augmente la disponibilité de MerTK à la surface<br>cellulaire.....               | 136 |
| Figure 24 : L'inhibition d'ADAM17 augmente l'activation de MerTK.....  | 137 |
| Figure 25 : Les acteurs de la phagocytose rétinienne après mes travaux de Doctorat.....                                  | 148 |
| Tableau 1: Nomenclature des récepteurs TAM (Tyro3, Axl, MerTK).....  | 46  |

## LISTE DES ANNEXES

|   |     |
|---|-----|
| Annexe 1 : Book chapter : A comprehensive review of mutations in the MERTK proto-oncogene. ....   | 168 |
| Annexe 2 : Article : Large-scale purification of photoreceptor outer segments for phagocytosis assays on retinal pigment epithelial cells. .... | 175 |



## AVANT-PROPOS

L'épithélium pigmentaire rétinien joue un rôle très important dans le processus de la vision. Il permet la survie et la fonctionnalité des photorécepteurs en réalisant notamment le recyclage par phagocytose des segments externes des photorécepteurs qui accumulent des radicaux libres au cours de la phototransduction. L'absence complète de phagocytose conduit à des pathologies qui se développent précocement comme des dystrophies bâtonnets-cônes, tandis que sa dérégulation peut conduire à des pathologies d'apparition plus tardive telle que la dégénérescence maculaire liée à l'âge. La machinerie de la phagocytose rétinienne fait intervenir le récepteur MerTK qui est essentiel pour l'internalisation des segments externes. Ce récepteur participe également à la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. Ces deux types de phagocytose utilisent sensiblement la même machinerie, cependant des différences existent au niveau de leur régulation. En effet, les macrophages phagocytent les cellules apoptotiques dès qu'un contact est établi. Par contre, dans la rétine le contact est permanent entre les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien, et la phagocytose des segments externes est très marquée sur une courte durée peu après l'arrivée de la lumière. Elle présente donc un rythme circadien et doit être finement régulée afin que l'élimination des segments externes ait lieu au bon moment et sur un temps limité.

Une façon de contrôler cette phagocytose est la régulation de l'activité de MerTK. La phosphorylation de MerTK, reflétant son activation, est augmentée juste au moment du pic de phagocytose par une cascade de signalisation intracellulaire. D'autres mécanismes permettant de réguler l'activité de MerTK ont été identifiés chez les macrophages. Gas6 et Protéine S, identifiés comme ligands extracellulaires de ce récepteur, stimulent la clairance des cellules apoptotiques. Très récemment une autre forme de régulation de ce récepteur a été décrite chez les macrophages : MerTK peut être clivé au niveau de son ectodomaine, libérant ainsi une forme soluble dans le milieu extracellulaire. Peu de recherches ont été menées sur l'étude de la régulation de l'activité de MerTK dans la phagocytose rétinienne. L'objectif de mon Doctorat a donc été d'identifier le mode d'action des acteurs extracellulaires qui entrent en jeu dans ce processus. Premièrement nous avons étudié le rôle des ligands, Gas6 et Protéine S dans la régulation de l'activité de MerTK au niveau de l'épithélium pigmentaire rétinien. En effet, ce n'est que très récemment que des études ont montré que ces deux ligands sont exprimés dans la rétine et qu'ils sont tous les deux essentiels à la phagocytose rétinienne.

Deuxièmement nous avons caractérisé le clivage de MerTK dans la rétine, et étudié des protéases candidates pouvant être impliquées dans ce processus de clivage.

Pour placer mon projet de Doctorat dans son contexte, une synthèse de la bibliographie actuelle est nécessaire. Je commencerai par décrire le système visuel en portant une attention particulière à l'épithélium pigmentaire rétinien, tissu responsable de la fonctionnalité et de la survie des photorécepteurs. Les principales études disponibles sur MerTK ayant été effectuées chez les macrophages, je présenterai la machinerie de la phagocytose utilisée pour réaliser la clairance des cellules apoptotiques. Je vais ensuite expliquer les mécanismes communs et les différences existant entre les processus de phagocytose des SEP et des cellules apoptotiques. Puis, j'exposerai l'ensemble des connaissances sur MerTK, ce récepteur essentiel pour la phagocytose rétinienne, ainsi que sur ses deux ligands, Gas6 et Protéine S. Pour finir cette synthèse je présenterai certaines protéases qui pourraient être impliquées dans le clivage de MerTK. Le contexte scientifique étant mis en place, je détaillerai ensuite les résultats obtenus au cours de mes années de Doctorat pour finir sur une discussion et les perspectives liées à mes travaux de recherche.

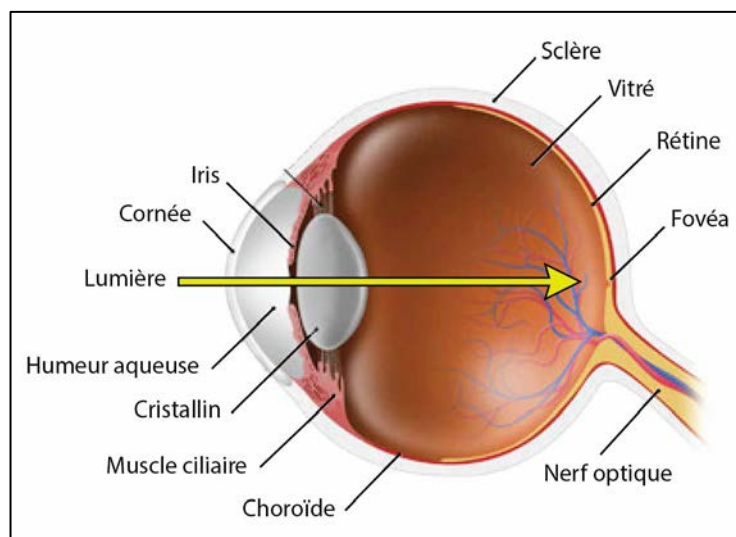
# INTRODUCTION

## I. Le système visuel

### 1. Présentation de l'œil

L'Homme possède 5 sens qui lui permettent d'évoluer, d'appréhender et d'échanger avec son environnement. Parmi ces 5 sens la vision permet de percevoir les couleurs, les formes et les positions. Elle est essentielle pour intégrer et apprécier le monde qui nous entoure et communiquer avec les autres.

L'œil est l'organe récepteur de la vision. Il fait partie des organes les plus perfectionnés et les plus complexes de notre corps. Il est capable de capter les photons, de transformer leur énergie en signal électrique et d'envoyer les informations visuelles au cerveau pour interprétation.



**Figure 1 : Représentation schématique d'un œil humain.**

Dans l'œil, les rayons lumineux, représentés par le trait jaune, traversent la cornée, l'humeur aqueuse, le cristallin et le vitré pour être captés par la rétine, tissu qui tapisse le fond de l'œil [Modifié d'après [virtualmedicalcentre.com](http://virtualmedicalcentre.com)].

Les rayons lumineux entrent dans l'œil par la cornée, membrane solide et transparente, qui protège l'œil des agressions physiques et bactériennes (Figure 1). La quantité de lumière qui entre dans l'œil est contrôlée par l'iris et la pupille qui agissent comme des diaphragmes. Les rayons lumineux traversent ensuite le cristallin, lentille capable de se déformer sous l'action des corps ciliaires, pour être focalisés sur la rétine. Derrière le cristallin se trouve le corps vitré, une substance transparente qui maintient la forme de l'œil et la rétine contre le

fond du globe oculaire. Finalement les rayons lumineux sont captés par la rétine, le tissu neurosensoriel de l'œil, qui permet la transformation du signal lumineux et son acheminement via le nerf optique au cortex visuel situé à l'arrière du cerveau, qui ensuite les interprète (Kolb, 1995a). Les caractéristiques neuronales de la plupart des cellules de la rétine permettent de considérer l'œil comme une extension du cerveau et une partie du système nerveux central.

## **2. La rétine**

La rétine est une fine membrane tapissant la totalité de la surface interne du globe oculaire. Elle se compose de la rétine neurale et de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR). Elle repose via l'EPR sur la choroïde qui est composée de la membrane de Bruch et d'un réseau capillaire, les choriocapillaires.

### **a) Organisation stratifiée de la rétine**

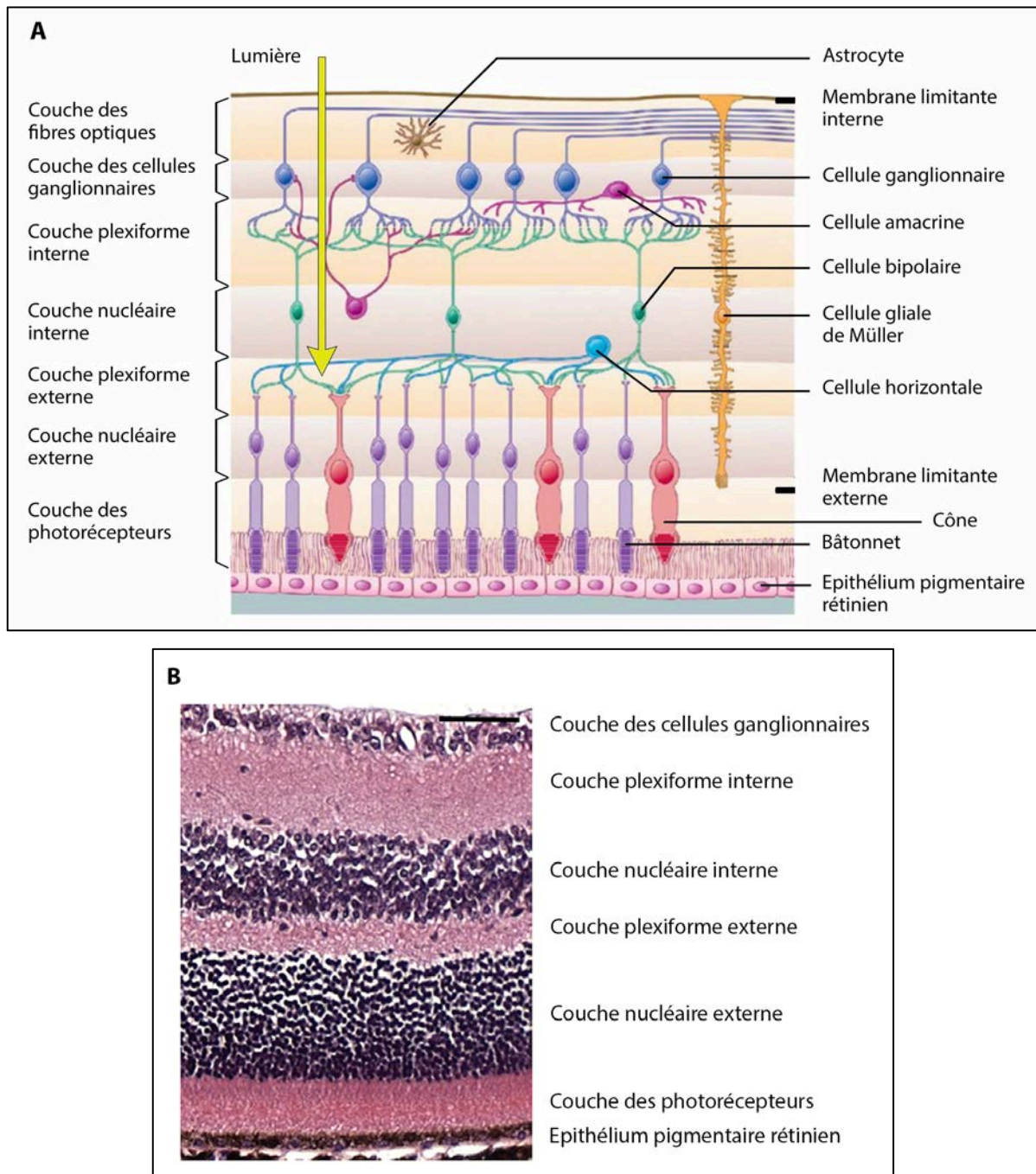
La rétine neurale est composée de plusieurs types de cellules : des neurones à transmission verticale (les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires), des neurones à transmission horizontale aussi appelés cellules d'association (les cellules horizontales et les cellules amacrines) et des cellules gliales (les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales) (Figure 2). Les cellules neuronales sont responsables de la transformation du signal lumineux et de son acheminement vers le cerveau. Les photorécepteurs captent les photons et transforment leur énergie lumineuse en un signal électrochimique au cours d'un processus appelé « cascade de phototransduction ». Ils transmettent ce signal aux cellules bipolaires, qui elles-mêmes le transmettent aux cellules ganglionnaires. Ces dernières acheminent l'information au cortex visuel via le nerf optique qu'elles forment avec leurs fibres. La transmission de ces signaux d'une cellule à l'autre s'effectue grâce à des synapses. A chaque relais, le signal peut être modifié par les cellules horizontales et amacrines qui établissent des connexions latérales avec les photorécepteurs, les cellules bipolaires et ganglionnaires. Les cellules d'association permettent ainsi d'améliorer le contraste et la définition du stimulus visuel en inhibant ou en activant les cellules.

Les cellules gliales n'interviennent pas directement dans le processus de la vision mais sont importantes pour le maintien de l'homéostasie de la rétine. Les cellules gliales de Müller constituent les principales cellules gliales de la rétine. Elles traversent toute l'épaisseur de la

rétine, leurs corps cellulaires se situent dans la couche nucléaire interne et ses nombreux prolongements cytoplasmiques entourent l'ensemble des neurones de la rétine, participant ainsi au bon fonctionnement de ces cellules. Elles participent également à la formation de la barrière hémato-rétinienne (BHR) interne (voir Chapitre I. 2. c). Les cellules microgliales représentent les principales cellules immunitaires résidentes de la rétine en condition non pathologique (Perry and Gordon, 1988). Elles sont en faible nombre dans la rétine et uniquement dans la couche des axones des cellules ganglionnaires. En condition pathologique, elles sont activées et migrent à travers la rétine vers la région lésée pour dégrader les débris cellulaires (Cuenca et al., 2014).

La rétine est un tissu organisé en couches cellulaires successives constituées de l'intérieur vers l'extérieur de l'œil (du vitré vers la choroïde) comme suit (Kolb, 1995a) :

- la membrane limitante interne, membrane en contact avec le vitré et contenant les pieds proximaux des cellules de Müller,
- la couche des fibres optiques, constituée par les axones des cellules ganglionnaires qui se rassembleront pour former le nerf optique,
- la couche des cellules ganglionnaires, constituée par les corps cellulaires des cellules ganglionnaires,
- la couche plexiforme interne, formée par les synapses entre les cellules ganglionnaires, bipolaires et les cellules amacrines,
- la couche nucléaire interne, qui contient les corps cellulaires des cellules bipolaires, amacrines, horizontales et des cellules de Müller,
- la couche plexiforme externe, contenant les synapses des cellules bipolaires, horizontales et des photorécepteurs,
- la couche nucléaire externe, formée par le corps cellulaire des photorécepteurs,
- la membrane limitante externe, qui constitue une zone d'adhérence entre les photorécepteurs et les pieds distaux des cellules gliales de Müller,
- la couche des segments internes et externes des photorécepteurs,
- l'épithélium pigmentaire rétinien.



**Figure 2 : Organisation stratifiée de la rétine.**

(A) Schéma des cellules nerveuses composant la rétine dont les corps cellulaires et les interconnexions forment l'aspect en couches de la rétine. Les photons traversent toute l'épaisseur de la rétine avant d'être captés par les photorécepteurs. Ces derniers transforment l'énergie lumineuse en un signal électrochimique lors de la phototransduction. L'information est ensuite transmise aux cellules bipolaires qui elle-même la relayent aux cellules ganglionnaires dont les fibres nerveuses forment le nerf optique qui achemine les informations au cerveau. Les cellules horizontales et amacrines permettent la modulation de ce signal. Les cellules gliales de Müller et les astrocytes participent à l'homéostasie de la rétine. En face de la rétine neurale au contact des photorécepteurs se trouve l'épithélium pigmentaire rétinien [Modifié d'après <http://intranet.tdmu.edu.ua/data/kafedra/internal/anatomy/>]. (B) Marquage éosine et hématoxyline d'une coupe de rétine de souris adulte. Barre d'échelle = 50  $\mu$ m [Modifié d'après Mollema et al., 2011, PLoS One].

### **b) Le système vasculaire rétinien**

L'ensemble de l'œil est vascularisé par l'artère ophtalmique qui se divise pour donner différents réseaux vasculaires (Figure 3, A). La rétine reçoit son apport sanguin par un double système vasculaire : le réseau vasculaire rétinien provenant de l'artère centrale de la rétine qui entre dans l'œil via le nerf optique, et le réseau vasculaire choroïdien provenant des artères ciliaires, qui traversent la sclère au-dessus et en dessous du nerf optique (Pournaras et al., 2008).

Le système vasculaire rétinien est organisé en plusieurs couches interconnectées et prend en charge l'apport en besoins métaboliques des couches internes de la rétine (cellules ganglionnaires, bipolaires, amacrines, horizontales et cellules de Müller) (Figure 3, B).

La nutrition des photorécepteurs et de l'EPR s'effectue grâce au deuxième réseau vasculaire : le système choroïdien (Figure 3, B). Le système vasculaire choroïdien forme sous l'EPR un ensemble de capillaires très denses appelé les choriocapillaires. Ces capillaires sont fenestrés permettant la diffusion de protéines jusqu'à l'EPR via la membrane de Bruch. Ainsi les besoins métaboliques des photorécepteurs sont satisfaits par l'EPR qui évacue également leurs déchets (voir Chapitre I. 4. b).

### **c) Les barrières hémato-rétiniennes**

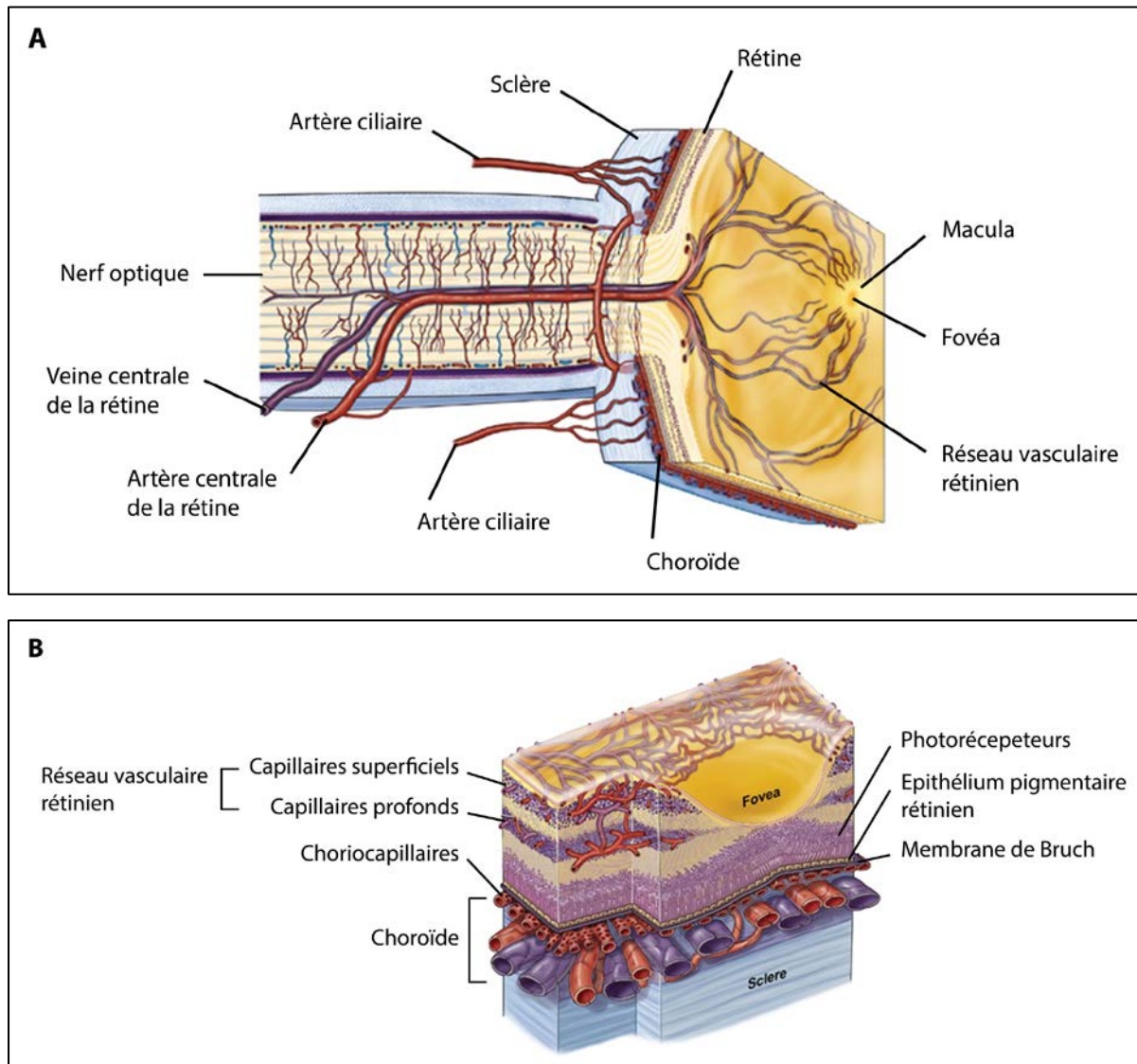
Les photorécepteurs et l'EPR sont isolés du système vasculaire par deux BHR : une externe et une interne. Ces barrières jouent un rôle important dans la régulation du microenvironnement de la rétine. Elles contrôlent les flux liquides et moléculaires entre les vaisseaux sanguins et les cellules de la rétine. Elles empêchent également l'entrée de macromolécules et autres agents pathogènes dans la rétine (Pournaras et al., 2008).

La BHR interne est formée par les jonctions serrées entre les cellules endothéliales entourées par les péricytes et par les pieds des cellules gliales de Müller. Les péricytes sont des cellules contractiles qui contrôlent le flux sanguin. Les pieds des cellules gliales de Müller contribuent à l'intégrité de l'étanchéité et de la vasomotricité des vaisseaux (Cunha-Vaz et al., 2011).

La BHR externe est constituée par les jonctions serrées de l'EPR, qui leur confèrent un haut degré de contrôle de passage des fluides entre la circulation sanguine choroïdienne et la rétine neurale. En effet, les choriocapillaires sont fenestrés les rendant très perméables. L'EPR, de par ses jonctions serrées et la synthèse de cytokines anti-inflammatoires, crée le



privilège immun au niveau des segments internes et externes des photorécepteurs. En effet, il protège cette zone, appelé espace sous-rétinien, de l'invasion de micro-organismes et de cellules immunitaires pouvant provenir de la circulation sanguine. En conditions physiologiques, ce privilège immun permet d'éviter les réactions inflammatoires qui pourraient être à l'origine d'une perte de fonction visuelle.



**Figure 3 : Schémas des réseaux vasculaires de la rétine.**

La rétine est vascularisée par deux réseaux vasculaires. (A) Le réseau vasculaire rétinien provient de l'artère centrale de la rétine et passe par le nerf optique irriguant ainsi les couches internes de la rétine. La choroïde, le deuxième réseau vasculaire, provient de l'artère ciliaire qui traverse la sclère. (B) Le réseau vasculaire rétinien forme deux réseaux de capillaires pour la vascularisation de la rétine. La choroïde forme sous l'épithélium pigmentaire rétinien les choriocapillaires, essentiels pour les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire rétinien [Modifié d'après Newman, 2013, *J Cereb Flow Metab*].



Des altérations de ces deux barrières peuvent jouer un rôle crucial dans le développement de pathologies rétinienne. Les pathologies les plus fréquentes sont la rétinopathie diabétique initiée par une altération de la BHR interne, et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) résultant d'un défaut de la BHR externe dû à la perte des cellules d'EPR ou de leurs jonctions serrées (Cunha-Vaz et al., 2011; Klaassen et al., 2013).

### **3. Les photorécepteurs**

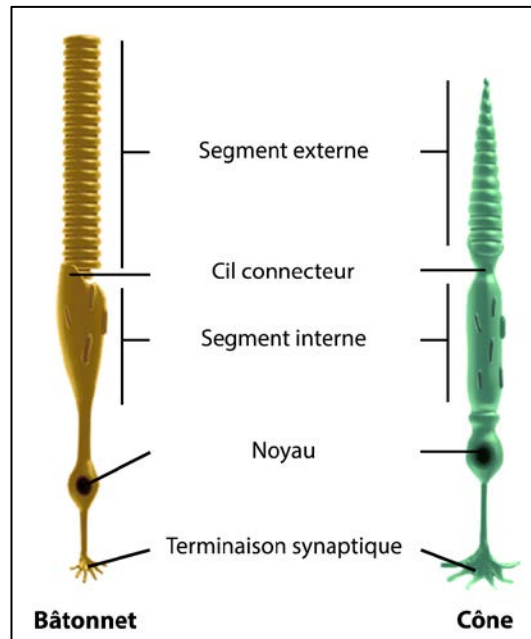
#### **a) Organisation cellulaire**

Il existe deux types de photorécepteurs dans la rétine : les cônes et les bâtonnets. Ils tirent leur nom de leur morphologie : cylindrique et allongée pour les bâtonnets et conique pour les cônes (Figure 4). Ils sont composés (i) d'une synapse en contact avec les cellules bipolaires et horizontales, (ii) d'un corps cellulaire contenant le noyau, (iii) d'un segment interne contenant la machinerie nécessaire au métabolisme cellulaire et de nombreuses mitochondries permettant la synthèse d'ATP, et (iv) d'un segment externe qui est formé par l'empilement de disques membranaires. Les disques sont isolés de la membrane plasmique pour les bâtonnets ou formés par de simples repliements de la membrane pour les cônes (Kolb, 1995b). Dans ces disques, structures très spécialisées, sont enchâssés les photopigments, les opsines, molécules sensibles à la lumière impliquées dans la première étape de la phototransduction (voir Chapitre I. 3. b). Le segment interne et le segment externe sont reliés par le cil connecteur qui permet le transport des protéines entre les deux compartiments.

Selon les espèces, la répartition des photorécepteurs n'est pas la même sur toute la rétine. Chez les rongeurs, les cônes et les bâtonnets sont repartis uniformément, tandis que chez les primates et l'Homme, les cônes sont concentrés dans une région particulière appelée la macula. La partie centrale de la macula, la fovéa, est composée exclusivement des corps cellulaires des cônes, les autres cellules semblent être « poussées » sur le côté de cette région. La fovéa représente la zone d'acuité maximale de la rétine. On distingue également une zone au niveau de la rétine où il n'y a pas de photorécepteurs : il s'agit de la tache aveugle, lieu de rassemblement des fibres des cellules ganglionnaires pour donner naissance au nerf optique en direction du cerveau.

Chez l'Homme et les grands primates, la rétine contient environ 20 fois plus de bâtonnets (environ 92 millions) que de cônes (environ 4,6 millions) (Curcio et al., 1990).

Chez le rat et la souris, la rétine est composée essentiellement de bâtonnets (Carter-Dawson and LaVail, 1979).



**Figure 4 : Représentation schématique des deux types de photorécepteurs.**

Il existe deux types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets, nommés ainsi selon leur forme. Ils sont composés d'une terminaison synaptique, d'un noyau, d'un segment interne et d'un segment externe constitué par l'empilement de disques. Les cônes permettent la vision diurne, de précision et des couleurs, tandis que les bâtonnets permettent la vision nocturne et périphérique [Modifié d'après [www.lyceeadulte.fr](http://www.lyceeadulte.fr)].

Les cônes et les bâtonnets ne remplissent pas les mêmes fonctions pour la vision. D'une part, les cônes sont responsables de la vision photopique (diurne), des détails et des couleurs (Sung and Chuang, 2010). Dans la rétine humaine il existe 3 types de cônes en fonction de la longueur d'onde maximale d'absorption de leur opsine. Les cônes de type L (long) présentent une capacité maximale d'absorption des photons pour de grandes longueurs d'onde situées vers 560 nm (dans le rouge) ; les cônes M (milieu) vers 530 nm (dans le vert) et les cônes S (short) vers 420 nm (dans le bleu) (Bowmaker and Dartnall, 1980). Ces trois types de protéines permettent la vision des couleurs, qui est totalement créée par le cerveau après une analyse combinée des informations envoyées et partiellement traitées par les diverses cellules rétiniennes. D'autre part, les bâtonnets sont responsables de la vision scotopique (nocturne) et de la vision périphérique. Ils n'expriment qu'un seul type d'opsine, appelée la rhodopsine, qui représente 90% des protéines présentes dans les segments externes des bâtonnets et qui absorbe la lumière vers 495 nm. La rhodopsine n'a besoin que d'un photon pour être excitée, alors que les opsines de cônes doivent recevoir de nombreux

photons pour initier la cascade de phototransduction. Ainsi, pendant la journée, la rétine est capable d'absorber toutes les secondes les 100 millions de photons qui l'atteignent grâce aux cônes, les bâtonnets étant saturés dès 1000 photons. Pendant la nuit ou l'obscurité, la vision est assurée par ces bâtonnets tandis que les cônes eux ne sont pas stimulés (Rieke and Baylor, 1998).

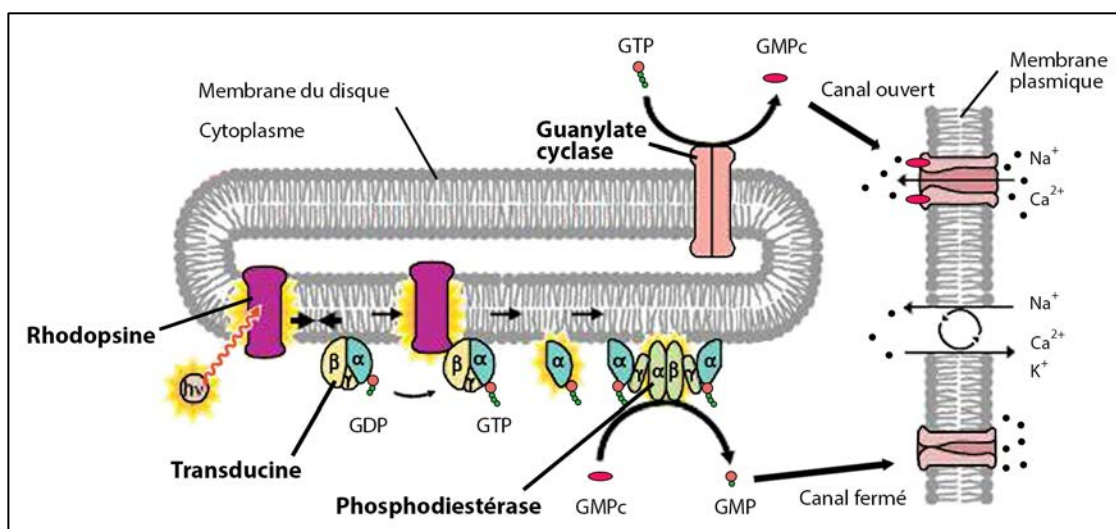
### b) Fonction visuelle

La phototransduction est le mécanisme par lequel les photorécepteurs transforment l'énergie lumineuse en un signal nerveux interprétable par le cerveau (Fu, 1995).

A l'obscurité, grâce à une forte concentration en GMP cyclique (GMPc), les canaux cationiques sodiques ( $\text{Na}^+$ ) et calciques ( $\text{Ca}^{2+}$ ) des segments externes des photorécepteurs (SEP) sont ouverts en permanence (Figure 5). Dans le segment interne, les ions potassiques sortent vers le milieu extracellulaire. Ce flux d'ions provoque un courant dépolarisant appelé « courant d'obscurité ». Cet état de dépolarisation permanente des photorécepteurs induit une libération continue de leur neurotransmetteur, le glutamate.

La lumière initie au sein des SEP l'isomérisation du 11-*cis*-rétinal en tout-*trans*-rétinal, qui se trouve au centre de la molécule d'opsine. Cette opsine photo-activée active la transducine, une protéine G composée de trois sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , en catalysant l'échange d'un GDP pour un GTP. La dissociation de la sous-unité  $\alpha$  liée au GTP de la transducine active à son tour une phosphodiesterase (PDE). La PDE ainsi activée hydrolyse très rapidement le GMPc cytoplasmique en GMP. La chute du taux de GMPc intracellulaire entraîne la fermeture des canaux cationiques situés au niveau des SEP. Dans le même temps, les canaux de fuite calciques et potassiques situés au niveau des segments internes des photorécepteurs sont toujours ouverts entraînant une hyperpolarisation des photorécepteurs ce qui inhibe la libération du neurotransmetteur, le glutamate, au niveau du bouton synaptique du photorécepteur. Dans la phase de récupération, l'opsine photo-activée est désensibilisée par phosphorylation et liaison avec l'arrestine. La quantité de GMPc revient à un niveau de base grâce à la guanylate cyclase provoquant la réouverture des canaux cationiques (Sung and Chuang, 2010). Le rétinal isomérisé quant à lui est transporté soit vers l'EPR, soit vers les cellules gliales de Müller, pour être régénéré en 11-*cis*-rétinal ou en 11-*cis* rétinol respectivement. Récemment il a été découvert que certains cônes expriment RPE65, l'enzyme permettant de régénérer le rétinal (voir Chapitre I. 4. b).

Les photorécepteurs sont reliés aux cellules bipolaires par des synapses. Il existe deux types de cellules bipolaires : les cellules bipolaires ON et OFF. Lorsqu'un photon est capté par un photorécepteur, il entraîne son hyperpolarisation et une diminution du taux de glutamate relargué. Si le photorécepteur est relié à une cellule bipolaire ON (hyperpolarisée à l'obscurité) celle-ci se dépolarise et libère à son tour du glutamate, tandis que si le photorécepteur est relié à une cellule bipolaire OFF (dépolarisée à l'obscurité), celle-ci s'hyperpolarise inhibant ainsi la libération de glutamate (Kolb, 2003). Les cellules ganglionnaires sont complémentaires des cellules bipolaires et transmettent l'information de ces dernières au cortex visuel du cerveau en émettant des potentiels d'action.



**Figure 5 : Molécules impliquées dans la cascade de phototransduction.**

A l'obscurité la guanylate cyclase hydrolyse le GTP en GMP cyclique (GMPc). Le GMPc maintient ouverts les canaux cationiques dépendants du GMPc, permettant un influx de calcium et de sodium dans la cellule. La lumière ( $h\nu$ ) provoque l'isomérisation du 11-*cis*-rétinal en tout-*trans*-rétinal, ce qui active la rhodopsine. La rhodopsine ainsi activée peut lier la transducine, protéine G avec 3 sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , pour l'activer à son tour. La sous-unité  $\alpha$  liée à un GTP active ensuite la phosphodiésterase qui hydrolyse le GMPc en GMP, réduisant ainsi la concentration de GMPc dans la cellule et la liaison du GMPc aux canaux cationiques correspondants. Le sodium et le calcium n'entrent plus dans la cellule, provoquant une hyperpolarisation de la membrane [Modifié d'après [www.lookfordiagnosis.com](http://www.lookfordiagnosis.com)].

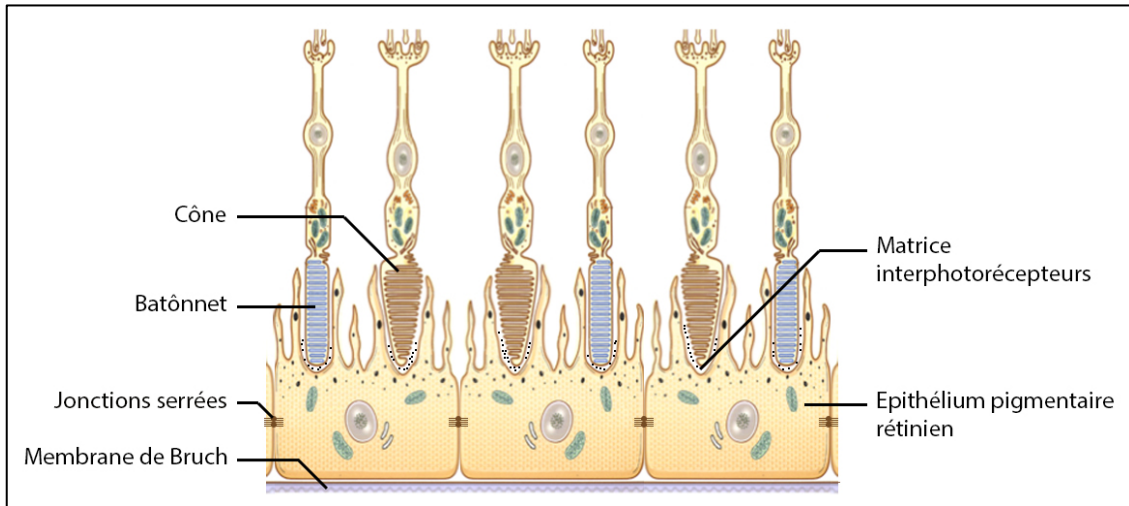
La phototransduction entraîne une forte consommation d'oxygène qui s'accompagne d'une production de radicaux libres engendrant du stress oxydatif dans les SEP. Ces radicaux libres causent des dommages sur les membranes cellulaires, les protéines et l'ADN. La phototransduction est dépendante de la fonction et de la structure des protéines, du rétinol et des membranes des photorécepteurs. Les photorécepteurs possèdent peu d'enzymes de détoxification capables d'éliminer ces radicaux libres (Winkler, 2008). Ainsi pour maintenir leur excitabilité et lutter contre ce stress oxydatif, les photorécepteurs renouvellent

constamment leur SEP à partir de la base de leur segment externe au niveau du cil. La partie la plus distale des SEP, qui contient la plus grande quantité de radicaux libres, est éliminée par l'EPR afin que les SEP conservent une longueur égale (voir Chapitre I. 4. b).

## **4. L'épithélium pigmentaire rétinien**

### **a) Organisation cellulaire**

L'EPR est un épithélium constitué d'une couche unique de cellules pigmentées, polarisées, post-mitotiques et de forme hexagonale, situé entre la choroïde et la rétine neurale. Les cellules liées entre elles par des jonctions serrées participent ainsi à la BHR externe (voir Chapitre I. 2. c) (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001). Ces cellules reposent sur la membrane de Bruch du côté basal et sont en contact avec les photorécepteurs du côté apical (Figure 6). Ces cellules possèdent une distribution particulière de leurs organites. En effet, dans la partie basale de ces cellules se trouve le ou les noyaux, certaines cellules étant binucléées, ainsi que les mitochondries. Dans la partie apicale de ces cellules se trouvent des extensions des réticulums endoplasmiques lisse et rugueux, des mélanosomes lui conférant son nom de 'pigmenté', les phagosomes et les liposomes. Au cours du vieillissement, des granules de lipofuscine dérivés de la phagocytose des SEP s'accumulent au niveau du cytoplasme. Les membranes sont également différentes aux deux pôles. La membrane basale possède de nombreuses invaginations courtes qui permettent d'augmenter la surface d'échange avec la membrane de Bruch. La membrane apicale possède deux types de microvillosités : de longs microvilli qui augmentent la surface d'échange de la membrane et de courts microvilli qui contribuent à la phagocytose rétinienne quotidienne (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001; Cuenca et al., 2014).



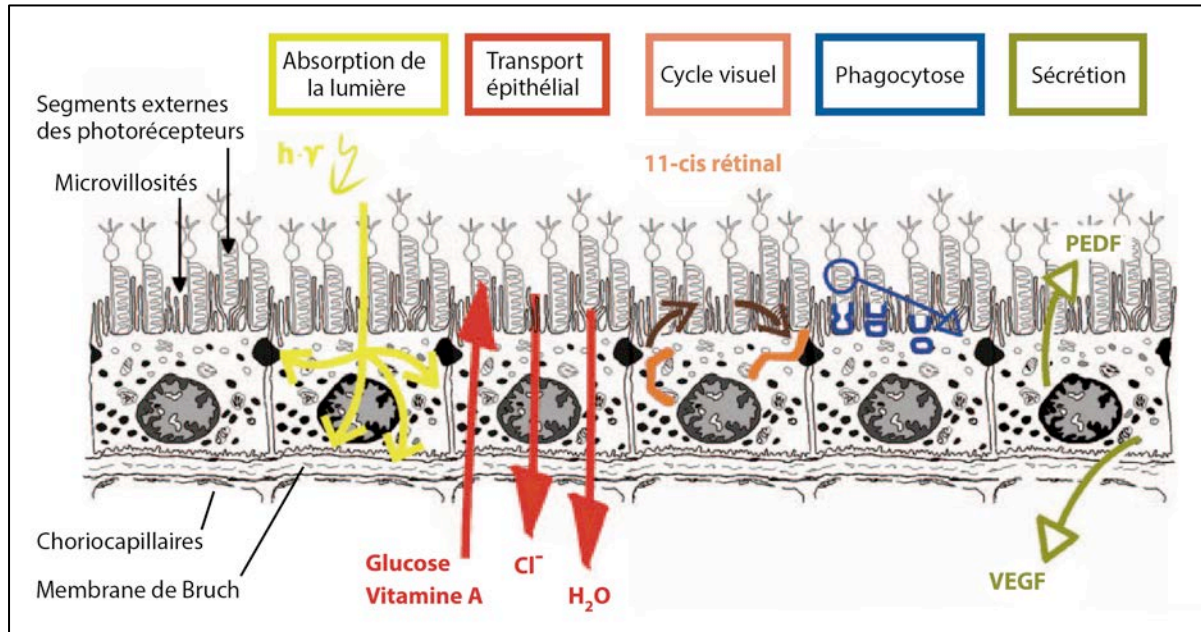
**Figure 6 : L'épithélium pigmentaire rétinien est en contact étroit avec les photorécepteurs.**

Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien sont polarisées et sont maintenues entre elles par des jonctions serrées imperméables. Sa membrane apicale est composée de microvillosités qui enchâssent les segments externes des photorécepteurs, et sa membrane basale repose sur la membrane de Bruch en contact avec les choriocapillaires [Modifié d'après *Chang et Finnemann, 2006*].

#### **b) Fonctions biologiques de l'épithélium pigmentaire rétinien**

L'interaction entre l'EPR et les photorécepteurs ainsi que la polarité des cellules de l'EPR sont cruciales pour maintenir l'intégrité structurelle et fonctionnelle des photorécepteurs. En effet, l'EPR remplit cinq fonctions principales et essentielles à la fonction visuelle. Il réalise le recyclage des pigments visuels utilisés par les photorécepteurs, le transport actif de métabolites pour nourrir et évacuer les déchets de la rétine neurale, la sécrétion de facteurs de croissance, la protection de la rétine contre la photo-oxydation, et enfin la phagocytose des SEP (Figure 7) (Strauss, 2005).





**Figure 7 : Les fonctions de l'épithélium pigmentaire rétinien.**

L'épithélium pigmentaire rétinien est essentiel à la fonctionnalité et à la survie des photorécepteurs. Il permet d'absorber les photons parasites grâce à ses nombreux pigments de mélanine (jaune). Il réalise un transport épithélial entre les photorécepteurs et la choroïde pour nourrir les photorécepteurs et évacuer leurs déchets métaboliques (rouge). Il participe au cycle visuel en réalisant la ré-isomérisation du rétinol, molécule essentielle pour la phototransduction (orange). Il phagocyte les segments externes des photorécepteurs riches en radicaux libres suite à la phototransduction (bleu). Enfin l'épithélium pigmentaire rétinien sécrète des facteurs de croissance, le VEGF pour maintenir la choroïde et le PEDF pour la survie des photorécepteurs (vert kaki) [Modifié d'après Strauss, 2005, *Physiol Rev*].

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre I. 3. b, lorsque les photorécepteurs captent un photon le chromophore lié à l'opsine change de conformation. Il passe de sa conformation active, 11-*cis*-rétinal, à sa conformation inactive, tout-*trans*-rétinal. Les bâtonnets ne possèdent pas de *cis-trans* isomérase et sont donc incapables de régénérer le tout-*trans*-rétinal en 11-*cis*-rétinal. Il existe deux voies permettant la ré-isomérisation du rétinol. La première et la plus connue s'effectue dans l'EPR et est appelée le cycle visuel du rétinol dans l'EPR (Baehr et al., 2003). Le tout-*trans*-rétinal est réduit en tout-*trans*-rétinol par une déshydrogénase dans le cytoplasme des photorécepteurs. Cette forme est ensuite transportée à travers la matrice interphotorécepteurs (MIP) des SEP vers l'EPR grâce à une protéine cargo IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein) (Jin et al., 2009). Une fois dans la cellule de l'EPR le rétinol est re-isomérisé en 11-*cis* rétinol grâce à l'isomérase RPE65 (retinal pigment epithelium-specific protein 65 kDa), puis oxydé en 11-*cis*-rétinal (Moiseyev et al., 2005). Le 11-*cis*-rétinal sort de l'EPR pour retourner dans les SEP via IRBP. Une fois dans les disques des photorécepteurs, le chromophore peut de nouveau se lier à une molécule d'opsine pour capter les photons. En 2002, Mata et ses collègues ont montré l'existence d'une

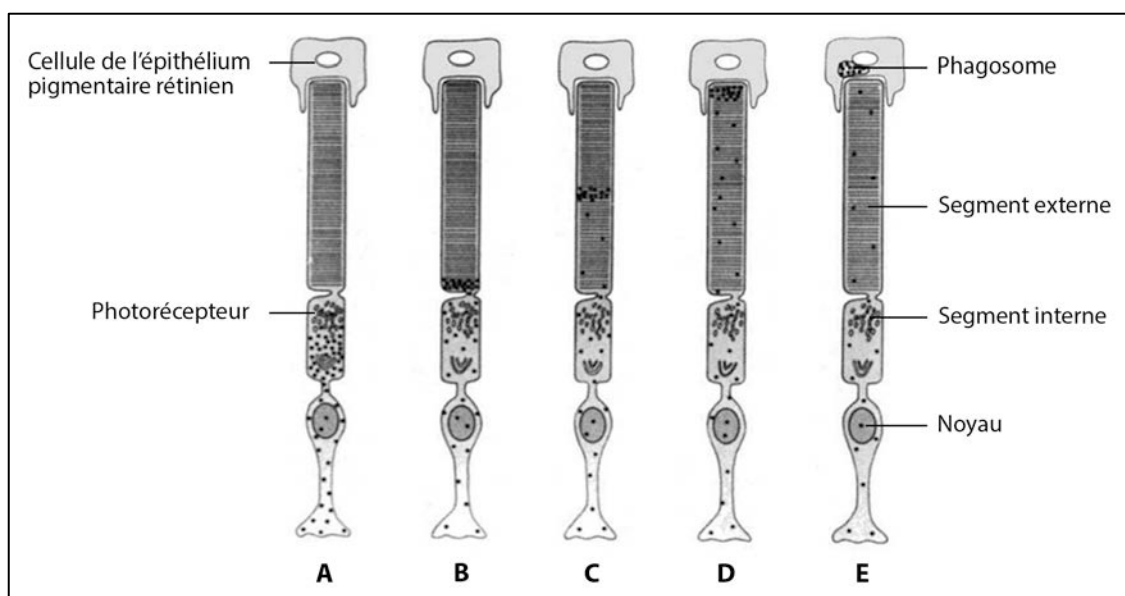
autre voie de ré-isomérisation du rétinol pour les cônes (Mata et al., 2002). Les cônes fonctionnant dans des conditions de forte luminosité, leur taux de photopigment à régénérer excède la capacité de l'EPR à recycler le chromophore. Cette voie est localisée uniquement dans la rétine neurale (cycle visuel intra-rétinien). Les cônes sont capables d'utiliser le 11-*cis* rétinol produit par les cellules gliales de Müller comme source de chromophore en l'oxydant en 11-*cis*-rétinal. Les bâtonnets étant incapables d'utiliser le 11-*cis* rétinol, l'EPR est indispensable pour assurer une excitabilité constante de cette catégorie de photorécepteurs. De plus, récemment une équipe a montré que chez certains rongeurs les cônes de la rétine expriment RPE65 (Tang et al., 2011a). Ils ont également montré que les cônes verts et rouges de l'Homme expriment RPE65 au niveau de leurs SEP (Tang et al., 2011b). *In vitro* ces cellules semblent utiliser RPE65 afin de régénérer rapidement le rétinol.

L'EPR réalise un transport transépithélial pour assurer le transport de l'eau, des nutriments et des ions entre les photorécepteurs et la choroïde. L'activité métabolique intense des photorécepteurs est à l'origine d'une augmentation régulière du volume d'eau dans la rétine. De plus, la pression oculaire conduit à un mouvement de l'eau vers le fond de l'œil. L'EPR permet d'éliminer cette eau vers la choroïde grâce à des canaux spécifiques, les aquaporines-1 (AQP1) situées dans les membranes apicales et basales (Stamer et al., 2003). Ce mouvement d'eau permet de maintenir la rétine contre l'EPR et est couplé à celui des ions chlore et potassium. En effet, à cause des jonctions serrées entre les cellules d'EPR, l'eau ne peut donc pas être évacuée par une voie para-cellulaire. La présence d'une  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  du côté apical de l'EPR permet de fournir l'énergie nécessaire au transport transépithélial, de créer un gradient ionique favorisant le passage de plusieurs ions et de l'eau de l'espace sous-rétinien vers la choroïde. Il permet également d'apporter la quantité d'oxygène nécessaire aux photorécepteurs pour fonctionner. L'EPR permet également d'éliminer les déchets produits par les photorécepteurs comme l'acide lactique. De plus, les photorécepteurs n'étant pas vascularisés, l'EPR assure leur nutrition en captant le glucose et autres nutriments de la choroïde.

L'EPR est également connu pour produire et sécréter de nombreux facteurs de croissance qui sont indispensables à la mise en place et au maintien de la rétine et de la choriocapillaire (Strauss, 2005). Parmi ces nombreux facteurs de croissance, les deux les plus connus et les mieux étudiés sont le PEDF (pigment epithelium-derived factor) et le VEGF (vascular endothelium growth factor) (Adamis et al., 1993). Le PEDF participe au maintien de la structure de la rétine en la protégeant de l'apoptose induite par le glutamate et l'hypoxie. Le



PEDF est également considéré comme un inhibiteur de l'angiogenèse car il limite la prolifération des cellules endothéliales de la choroïde (Bouck, 2002). Le VEGF protège les cellules endothéliales de l'apoptose et stabilise les fenestrations de l'endothélium de la choroïde. Ces deux facteurs sont sécrétés de part et d'autre de la cellule de l'EPR : le PEDF est sécrété du côté apical vers les photorécepteurs, tandis que le VEGF est sécrété du côté basal en direction de la choroïde.

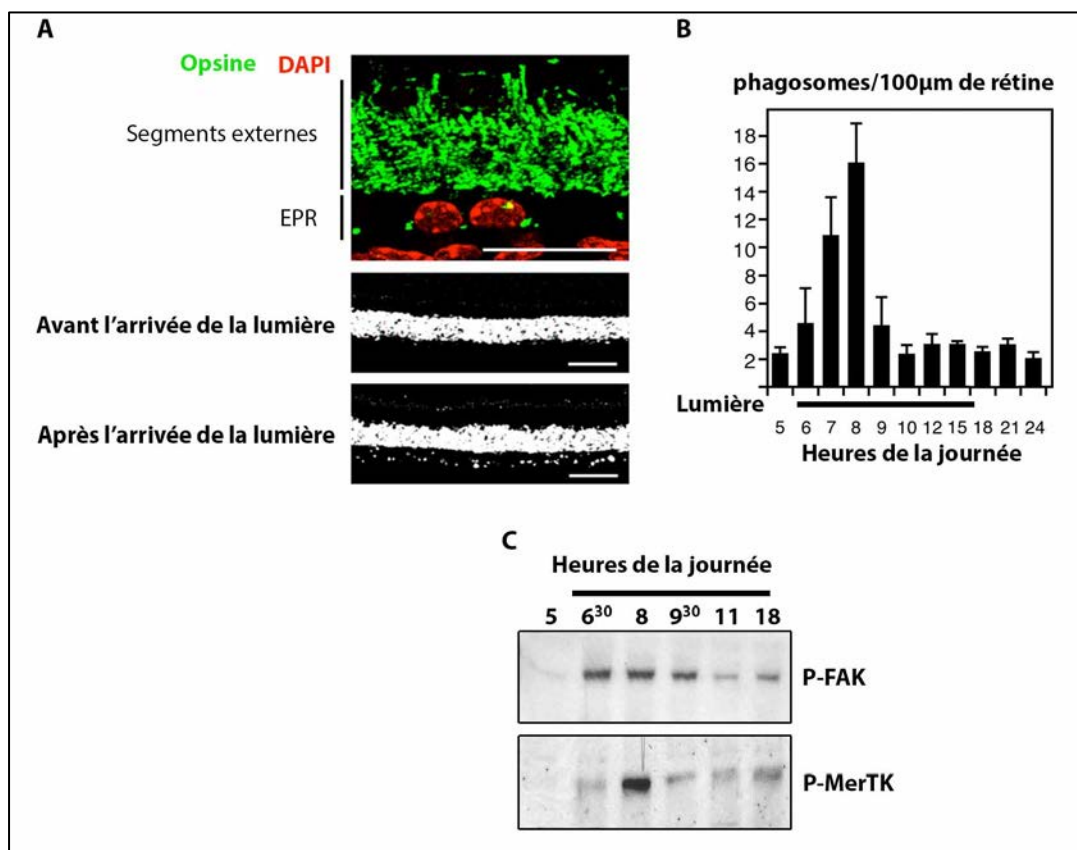


**Figure 8 : Mise en évidence du renouvellement des SEP et de la phagocytose rétinienne.**

Le renouvellement des disques des photorécepteurs a été mis en évidence grâce à des expériences de « pulse-chase » par Young et Bok en 1967. (A) La méthionine radiomarquée est incorporée dans la synthèse des protéines des photorécepteurs. (B) Les protéines radioactives nouvellement formées sont incorporées dans les disques à la base du segment externe. (C-D) Au cours du temps ces disques marqués sont déplacés progressivement le long du segment externe montrant la formation répétée des disques à partir de la base de ces segments externes. (E) Quand les disques marqués atteignent la fin du segment externe, ils s'en détachent et sont retrouvés dans des phagosomes de l'épithélium pigmentaire rétinien, mettant ainsi en évidence la phagocytose de ces disques par l'épithélium pigmentaire rétinien [Modifié d'après Alberts *et al*, 1994, *Mol Biol of the Cell 3rd ed.*].

Une des fonctions importantes de l'EPR est sa participation active au renouvellement des SEP. En effet, comme nous l'avons vu les photorécepteurs renouvellent leur SEP afin de lutter contre le stress oxydatif engendré par les photons lumineux. Ce taux de renouvellement des disques a été mis en évidence et évalué en 1967 par le docteur Young : chez le rat et la souris chaque bâtonnet régénère son segment externe en 10 jours (Young, 1967). Des expériences de « pulse-chase » avec des acides aminés radiomarqués ont montré une bande de protéines radioactives qui se déplace au cours du temps le long du SEP en partant de sa base, et qui se retrouve ensuite dans l'EPR (Figure 8) (Young and Bok, 1969). Chaque cellule de l'EPR interagit avec 20 à 30 photorécepteurs (Bhutto and Lutty, 2012). Ces cellules sont post-

mitotiques, ce qui en fait les phagocytes les plus actifs du corps humain. En 1976, LaVail a montré que cette phagocytose présente un rythme au cours du cycle jour-nuit (Figure 9, A et B) (LaVail, 1976). En effet, il constate que la quantité de phagosomes présents dans les cellules de l'EPR atteint un maximum deux heures après l'arrivée de la lumière alors qu'elle est restreinte le reste du cycle. Cette phagocytose rythmique est très conservée comme le démontrent les études sur les nombreuses espèces d'animaux : les poissons, les amphibiens, les oiseaux et les mammifères, comme le rat, la souris, le chat et le singe (Anderson et al., 1980; Basinger et al., 1976; Fisher et al., 1983; LaVail, 1980; O'Day, 1978; Young, 1978). La phagocytose s'effectue classiquement en plusieurs étapes : la reconnaissance, la liaison, l'internalisation, que nous verrons plus en détail dans le Chapitre II. 1, et enfin la digestion. Une fois internalisés, les phagosomes subissent des phénomènes de maturation conduisant à la dégradation de leurs protéines et lipides. Ainsi le phagosome va fusionner avec les endosomes précoces, tardifs et enfin les lysosomes (Kevany and Palczewski, 2010). Certaines molécules importantes pour les photorécepteurs sont recyclées et leur sont délivrées comme c'est le cas du 11-*cis*-retinal. D'autres sont complètement digérées et évacuées dans le sang via la choroïde. C'est le cas de l'opsine qui est détruite par la cathepsine D, protéine présente dans les lysosomes de toutes les cellules (Rakoczy et al., 1999). D'autres encore restent piégées dans les cellules de l'EPR sous forme de granules de lipofuscine. La lipofuscine provient de résidus modifiés de la digestion incomplète des SEP (Katz and Robison Jr, 2002). Les granules de lipofuscine contiennent des lipides, des protéines et molécules photoréactives, comme le di-rétinoïde-pyridinium-éthanolamine (A2E) qui est un générateur possible d'espèces réactives de l'oxygène et qui possède donc des effets photo-toxiques (Sparrow and Boulton, 2005). L'accumulation progressive de granules de lipofuscine dans les cellules de l'EPR avec l'âge constitue l'une des caractéristiques majeures du vieillissement observée dans l'EPR et qui au-delà d'un certain seuil peut être à l'origine de pathologies visuelles comme la DMLA.



**Figure 9 : La phagocytose rétinienne présente un rythme circadien.**

(A) Photographie de coupes de rétine incluse en paraffine montrant l'opsine des photorécepteurs dans les cellules d'épithélium pigmentaire rétinien (phagosomes). Avant l'arrivée de la lumière, très peu de phagosomes sont présents dans l'épithélium, tandis que le nombre de phagosomes est très important après l'arrivée de la lumière. (B) Quantification du nombre de phagosomes présents dans l'épithélium pigmentaire rétinien sur 100 μm de rétine en fonction des heures de la journée. Au moment de l'arrivée de la lumière (6 heures) la phagocytose augmente pour atteindre un maximum 2 heures plus tard (8 heures), puis elle revient à un niveau basal le reste de la journée. (C) Immunoblots représentant la phosphorylation de FAK et de MerTK au cours des heures de la journée. La phosphorylation de ces deux protéines se fait de façon séquentielle à partir de l'arrivée de la lumière. FAK est phosphorylée 30 minutes après l'arrivée de la lumière et MerTK au moment du pic de phagocytose [Modifié d'après Nandrot et al., 2004, *J Exp Med* et Nandrot et al., 2007, *PNAS*].

L'EPR est essentiel pour protéger l'ensemble de la rétine de la photo-oxydation. Comme précédemment décrit la rétine est un environnement idéal pour la production d'espèces réactives de l'oxygène (Beatty et al., 2000). Premièrement, la rétine a une grande consommation d'oxygène. Deuxièmement, elle est en permanence soumise à de fortes expositions lumineuses. Troisièmement, les membranes des photorécepteurs sont riches en acides gras polyinsaturés qui sont facilement oxydables, ce qui peut engendrer des réactions cytotoxiques. Quatrièmement, la rétine et l'EPR contiennent de nombreuses molécules photosensibles comme les opsines, la lipofuscine et les enzymes mitochondriales. Cinquièmement, la phagocytose des SEP par l'EPR est un processus qui engendre lui-même

du stress oxydatif au sein de l'EPR. Pour lutter contre cette photo-oxydation, l'EPR possède trois lignes de défenses (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001). La première est la présence de granules fusiformes de mélanine, les mélanosomes. Ce pigment absorbe fortement la lumière entre 400 et 800 nm, limitant ainsi la quantité de lumière réfléchie à l'intérieur de l'œil et améliorant considérablement la vue. Les antioxydants constituent la deuxième ligne de défense de la rétine. L'EPR possède des antioxydants enzymatiques et non enzymatiques dont leur rôle est d'inactiver les radicaux libres et d'absorber une partie des photons (Beatty et al., 1999)(BEATTY et al., 1999). La troisième ligne de défense de l'EPR est sa capacité à réparer les dommages causés par le stress oxydant sur l'ADN, les lipides et les protéines.

Toutes ces fonctions sont essentielles et un défaut de l'une d'entre elles peut conduire à la mort des photorécepteurs, à la dégénérescence rétinienne, à la perte de la vision et à long terme à la cécité (Cuenca et al., 2014).

### c) Les pathologies associées à des défauts fonctionnels de l'épithélium pigmentaire rétinien

Nous avons vu que les fonctions de l'EPR sont cruciales pour le maintien de la vue à long terme. En effet, toute dérégulation ou absence de ces fonctions entraîne des pathologies d'apparition plus ou moins précoce comme l'amaurose congénitale de Leber, le syndrome de Usher, la rétinite pigmentaire et la DMLA.

La rétinite pigmentaire (RP) est un ensemble de maladies génétiques hétérogènes dont la prévalence est de 1 cas pour 3000 à 5000 naissances (Ferrari et al., 2011). La RP est une dégénérescence rétinienne ciblant les bâtonnets de la périphérie de la rétine qui se manifeste par une cécité nocturne, suivie par un rétrécissement du champ visuel, une diminution de la vascularisation rétinienne et des dépôts pigmentaires proche de la fovéa. Les dommages sur la macula ne sont visibles qu'à des stades avancés de la pathologie. Cette pathologie se traduit donc par une perte de la vision périphérique et nocturne pendant l'adolescence suivie d'une perte de la vision centrale chez l'adulte allant jusqu'à la cécité. La plupart des gènes mutés sont exprimés dans les photorécepteurs et codent pour des protéines impliquées dans la phototransduction (*RHODOPSINE*, *PDE6*), le cycle visuel ou la structure des bâtonnets (*RPI*). Cependant, quelques gènes comme *RPE65* et *MERTK* sont exprimés au sein de l'EPR (Gal et al., 2000; Gu et al., 1997; Nandrot et al., 2000). D'autres sont ubiquitaires comme les facteurs d'épissage de la famille *PRPF*, mais entraînent seulement une pathologie visuelle qui paraît provenir de défauts de l'EPR (Farkas et al., 2014; Graziotto et al., 2011). La génétique

des RP est complexe et une corrélation directe entre phénotype et génotype n'existe pas. En effet, une même mutation dans un gène peut être à l'origine de différents phénotypes, tout comme un même phénotype peut être attribué à plusieurs gènes (Ferrari et al., 2011).

Une mutation du gène *RPE65* peut également être responsable d'une autre pathologie : l'amaurose congénitale de Leber (Morimura et al., 1998). Cette pathologie se caractérise par une très faible vision ou une absence totale de perception visuelle dès la naissance. Sa prévalence n'est que de 1/30000 naissances, mais cette pathologie compte pour plus de 5% des rétinopathies héréditaires, et représente 20% des cas de perte de vision chez les enfants. Cette pathologie progresse rapidement ; la dégénérescence rétinienne aboutit à la mort des photorécepteurs et de l'EPR, et donc à la cécité totale au cours de la première décennie de vie (Hollander et al., 2008; Kaplan et al., 2013).

Le syndrome de Usher de type 1B est causé par un défaut de phagocytose des SEP par l'EPR. Le gène muté pour cette pathologie est le gène de la *MYOSINE VIIa* (Weil et al., 1995). Cette protéine du cytosquelette est responsable de la localisation correcte des opsines dans les photorécepteurs, de RPE65 et des mélanosomes du côté apical de l'EPR et de l'acheminement des phagosomes vers les lysosomes dans l'EPR (Gibbs et al., 2003; Williams and Lopes, 2011). Cette pathologie se caractérise par une surdité neurosensorielle congénitale, une perte de la vision progressive due à un mécanisme de rétinite pigmentaire et parfois des troubles de l'équilibre dus à une atteinte du vestibule.

La DMLA est la principale cause de perte sévère et irréversible de la vision chez les personnes âgées (à partir de 50 ans) dans les pays industrialisés, et représente donc une préoccupation de santé publique grandissante avec le vieillissement de la population (Cuenca et al., 2014). Elle se définit par une dégénérescence progressive de la macula, qui aboutit à une perte de la vision centrale. Cette pathologie est multifactorielle. L'âge est le facteur de risque le plus important, et de nombreux autres facteurs entrent aussi en jeu, comme des facteurs environnementaux, de nutrition et génétiques. Avec l'âge, des changements interviennent dans la morphologie de l'EPR : il y a une accumulation des granules de lipofuscine, une réduction de la mélanine diminuant les capacités antioxydantes de l'EPR et une accumulation progressive de dépôts extracellulaires (drusens) entre l'EPR et la membrane de Bruch (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001). L'évènement majeur impliqué dans la DMLA est l'accumulation de lipofuscine dans l'EPR due à la dégradation incomplète des SEP (Delori et al., 2000). L'A2E, un des composants de la lipofuscine, bloque la dégradation des SEP dans les phagolysosomes et perturbe la synthèse d'ATP par les mitochondries (Finnemann et al.,

2002; Vives-Bauza et al., 2008). De plus, la lipofuscine est très sensible à la photo-oxydation, ce qui augmente les dommages cellulaires et rend les cellules encore plus vulnérables. Ainsi, un cercle vicieux d'oxydations et de dommages cellulaires se crée, entraînant la mort progressive des photorécepteurs et des cellules de l'EPR. En plus de cette accumulation de lipofuscine, le nombre de mélanosomes diminue car ils fusionnent en partie avec les lysosomes entraînant la dégradation de la mélanine dans l'EPR. Cette perte de mélanine peut aboutir à une diminution de la capacité de l'EPR à absorber la lumière et donc à une diminution de son potentiel antioxydant (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001). La formation des drusens entre l'EPR et la membrane de Bruch montre l'incapacité de l'EPR à dégrader correctement les SEP. Ces drusens sont constitués de débris cellulaire, lipides, protéines, lipoprotéines, phospholipides, triglycérides, cholestérols, acides gras polyinsaturés... (Cuenca et al., 2014). Ils entraînent des modifications structurelles de l'EPR (perte des jonctions serrées) qui permettent l'infiltration de monocytes et macrophages en provenance des choriocapillaires, pouvant ainsi conduire à la dégénérescence des cellules de l'EPR et des photorécepteurs (Cherepanoff et al., 2010; Sennlaub et al., 2013). L'ensemble des altérations décrites favorise le développement de la DMLA.

Il existe deux formes de DMLA qui, malgré des origines moléculaires physiopathologiques communes, se développent différemment. La forme sèche, ou atrophique, se développe lentement et possède une prévalence élevée (90% des cas) ; elle se caractérise par la formation de drusens sous les cellules d'EPR et une perte progressive de ces cellules. La forme humide, ou exsudative, se caractérise par une angiogenèse au niveau de la macula. Ces néo-vaisseaux sont en partie formés par l'augmentation de la sécrétion de VEGF par l'EPR (Witmer et al., 2003). Ils sont perméables, causant ainsi des infiltrations de fluides et de sang dans la rétine. Cette forme de DMLA se développe très rapidement et conduit à une cécité totale. Dans les deux formes de cette pathologie, le lien physique et fonctionnel entre l'EPR et les photorécepteurs d'une part, et l'EPR et la choroïde d'autre part, est altéré, ce qui aboutit à la mort cellulaire des tissus via des mécanismes d'apoptose (Bhutto and Luty, 2012).

## **II. La phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien**

### **1. La machinerie de la phagocytose : analogie avec les macrophages**

#### **a) La phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages**

Le concept fondamental du principe de la phagocytose a été découvert en 1882 par Elie Metchnikoff, ce qui lui a valu le prix Nobel de médecine en 1908. Il a décrit ce processus comme un des mécanismes de défense immunitaire contre les bactéries grâce aux globules blancs. Il existe plusieurs types de phagocytose : la phagocytose anti-pathogènes qui permet l'élimination des éléments étrangers au corps, et la phagocytose des cellules apoptotiques qui permet l'élimination des cellules endogènes en état de mort cellulaire programmée (Mao and Finnemann, 2015). Cette dernière est essentielle au maintien de l'homéostasie des tissus et pour éviter les réactions auto-immunes. Les cellules en apoptose modifient les molécules de leur surface cellulaire : elles expriment des signaux « eat-me », ou « mangez-moi », qui sont reconnus par les macrophages (Brown and Neher, 2012). Ces signaux sont l'exposition de phosphatidylsérines (PtdSer), le changement de charge et de glycosylation de certaines molécules à la surface cellulaire et l'exposition de la calréticuline qui est normalement une protéine du réticulum endoplasmique (Ravichandran, 2011). Parmi eux, le signal qui a été le plus étudié est l'exposition des PtdSer sur le feuillet externe de la membrane plasmique (Fadok et al., 1992). Les PtdSer sont normalement maintenues exclusivement sur le feuillet interne de la bicouche lipidique des cellules. Au cours de l'apoptose la flippase devient active permettant l'externalisation des PtdSer (Panatala et al., 2015). L'exposition des PtdSer est l'altération universelle la plus typique sur la surface des cellules apoptotiques : elle est observée dans de nombreux types cellulaires après induction de l'apoptose de différentes manières (Fadok et al., 1998).

Du côté macrophage, de nombreux récepteurs sont présents pour la reconnaissance des signaux « eat-me ». Il y a les récepteurs « scavengers » (SR-A, SR-B, CD36, ...), les lectines, les récepteurs du complément, ceux reconnaissant les lipoprotéines de faible densité (LDL) oxydées (CD36, CD68 et SR-A), CD14, les intégrines, les récepteurs tyrosines kinases Tyro3, Axl et Mer (récepteurs TAM) et enfin les récepteurs reconnaissant spécifiquement les PtdSer (Niedergang and Chavrier, 2005; Ravichandran, 2011). L'existence d'autant de récepteurs pour la reconnaissance des cellules apoptotiques est encore mal comprise. Henson, Savill et Fadok pensent que toutes les cellules phagocytaires n'expriment pas l'ensemble de ces

récepteurs, et que plusieurs modes de reconnaissance sont nécessaires pour initier la phagocytose (Henson et al., 2001; Savill and Fadok, 2000). Il est également possible que selon la nature de l'induction de l'apoptose, les récepteurs nécessaires à la reconnaissance des signaux « eat-me » ne soient pas les mêmes. Les PtdSer peuvent être reconnues de deux façons différentes : la première, directe, s'effectue par des protéines ancrées à la membrane et la deuxième, indirecte, est rendue possible par des protéines solubles réalisant un pont entre les PtdSer et des protéines membranaires (Ravichandran, 2011). Les récepteurs capables de reconnaître directement les PtdSer sont SR-B, CD36, CD68, des membres de la famille des mucines et des immunoglobulines des cellules T (TIM) (TIM-1, TIM-3 et TIM-4), l'inhibiteur 1 de l'angiogenèse du cerveau (BAI1) et la protéine Stabiline-2 (Greenberg et al., 2006; Kobayashi et al., 2007; Miyanishi et al., 2007; Park et al., 2007; Park et al., 2008). Les protéines solubles capables de reconnaître les PtdSer sont milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8), Growth arrest-specific 6 (Gas6) et Protéine S (détaillées dans le Chapitre IV) (Nakano et al., 1997; Hanayama et al., 2002). MFG-E8 est capable de se lier aux intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$ , tandis que Gas6 et Protéine S sont des ligands des récepteurs TAM (Lemke and Rothlin, 2008; Scott et al., 2001).

#### **b) La phagocytose des segments externes des photorécepteurs par l'épithélium pigmentaire rétinien**

La phagocytose des SEP par l'EPR présente des caractéristiques communes avec la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages. En 2012, l'équipe du Dr Finnemann a montré que la partie des SEP à phagocyter présente une exposition accrue des PtdSer sur leur feuillet externe juste avant que la phagocytose n'ait lieu (Ruggiero et al., 2012). Des récepteurs reconnaissant les PtdSer sont présents au niveau apical des cellules de l'EPR. Pour lier les SEP, l'EPR exprime spécifiquement l'intégrine  $\alpha\beta5$  au pôle apical sur toute la longueur des longs microvilli, alors que toutes les autres intégrines sont présentes dans la partie baso-latérale de ces cellules (Finnemann et al., 1997; Nandrot et al., 2004). Comme chez les macrophages, l'intégrine  $\alpha\beta5$  est capable de lier MFG-E8 qui réalise un pont entre les PtdSer et la cellule phagocytaire (EPR) (Nandrot et al., 2007). Les deux autres ligands solubles des PtdSer, Gas6 et Protéine S, sont également exprimés par l'EPR (Burstyn-Cohen et al., 2012; Prasad et al., 2006). Les récepteurs de la famille TAM sont également présents dans la rétine : MerTK (Mer tyrosine kinase) et Tyro3 sont fortement exprimés au niveau des microvilli courts des cellules de l'EPR, tandis que Axl n'est pas exprimé par ces cellules



(Prasad et al., 2006). MerTK est le récepteur nécessaire et essentiel pour l'internalisation des SEP par l'EPR (D'Cruz et al., 2000; Nandrot et al., 2000). Des récepteurs reconnaissant directement les PtdSer sont également exprimés par les cellules de l'EPR : CD14, les récepteurs de la famille « scavenger » SR-BI et SR-BII (Duncan et al., 2002; Elner et al., 2003; Provost et al., 2003). Leurs rôles dans la phagocytose rétinienne ne sont pas encore totalement élucidés. CD36 est exprimé au niveau apical des cellules d'EPR et semble moduler la vitesse d'internalisation des SEP par une voie de signalisation indépendante de celle de MerTK (Finnemann and Silverstein, 2001; Ryeom et al., 1996a; Ryeom et al., 1996b). En effet, *in vitro*, selon les doses d'anticorps utilisées pour bloquer CD36, une accélération ou une inhibition de l'internalisation des SEP est observée (Finnemann and Silverstein, 2001). CD36 ne semble pas avoir un rôle majeur dans la phagocytose rétinienne car en son absence sous des conditions standard, les souris ne développent pas de pathologie rétinienne (Sun et al., 2006). Cependant, elles sont beaucoup plus sensibles aux dommages induits par une forte exposition lumineuse. Sun et ses collègues proposent l'hypothèse qu'en condition de stress oxydatif, CD36 est activé par les nombreux phospholipides oxydés, conduisant à une augmentation de la phagocytose des SEP car celle induite par la voie classique de l'intégrine  $\alpha v \beta 5$  et MerTK n'est pas suffisante.

Bien que la reconnaissance des cellules à phagocyter soit similaire, des différences majeures existent entre la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages et la phagocytose rétinienne. Les cellules d'EPR lient les SEP assez lentement (environ deux heures) tandis que les macrophages lient un maximum de particules en 30 minutes (Finnemann and Rodriguez-Boulan, 1999). De plus, les macrophages sont capables de phagocyter de nombreuses particules diverses alors que les cellules d'EPR phagocytent préférentiellement un seul type de particules *in vivo*, les SEP (Mayerson and Hall, 1986). Une étude a montré que SEP et cellules apoptotiques étaient reconnues de manière équivalente par les macrophages et l'EPR (Finnemann and Rodriguez-Boulan, 1999). Comme nous l'avons vu précédemment ces deux types cellulaires utilisent des intégrines différentes pour lier les particules à phagocyter : l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  pour les macrophages et l'intégrine  $\alpha v \beta 5$  pour l'EPR. Une autre différence majeure est la présence d'un rythme de phagocytose dans la rétine. LaVail a montré que chez la souris, la phagocytose des bâtonnets présente un pic d'activité le matin (Figure 9, A et B) (LaVail, 1976). En effet, il y a 2,5 à 5 fois plus de phagosomes dans l'EPR entre 30 minutes et 2,5 heures après l'arrivée de la lumière comparé aux autres heures de la journée. Ce rythme semble intrinsèque au tissu et ne dépend pas de la

lumière. En effet, lorsque les souris sont en permanence dans le noir, la phagocytose rétinienne suit toujours un rythme circadien (LaVail, 1976). Il semble être influencé par des facteurs humoraux : l'injection de réserpine, qui diminue la noradrénaline dans la glande pinéale, bloque le pic de phagocytose (LaVail, 1976). Récemment, l'équipe du Dr Finnemann a montré que l'exposition des PtdSer au niveau des SEP suit également un rythme circadien qui correspond parfaitement à celui de la phagocytose (Ruggiero et al., 2012). En effet, *in vivo* au moment de l'arrivée de la lumière, la portion distale des SEP à éliminer présente un maximum de PtdSer au niveau de leur feuillet externe. Le rythme de la phagocytose est aboli chez les souris *intégrine  $\beta_5^{-/-}$*  et *MFG-E8<sup>-/-</sup>*, suggérant que le rythme d'externalisation des PtdSer au niveau de la partie des SEP à éliminer est sous le contrôle de l'EPR et plus précisément du couple intégrine  $\alpha\beta_5$ –MFG-E8.

La phagocytose rétinienne nécessite une régulation fine de ses acteurs. En effet, au contraire des macrophages et de leurs cibles, les SEP et les cellules d'EPR sont en contact permanent, pourtant la phagocytose présente un rythme circadien. De nombreuses études ont été et sont encore menées afin de comprendre la machinerie et la régulation de la phagocytose rétinienne. Deux récepteurs ont particulièrement été étudiés : l'intégrine  $\alpha\beta_5$  et MerTK.

## 2. Le rôle de l'intégrine $\alpha\beta_5$ dans la phagocytose rétinienne

### a) Rôle dans la liaison des segments externes et dans la rythmicité

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires impliqués dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. Ces récepteurs fonctionnent sous forme d'hétérodimère composés des sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ . En 1997, deux équipes ont mis en évidence l'implication de l'intégrine  $\alpha\beta_5$  dans l'étape de liaison des SEP aux cellules de l'EPR en bloquant ce récepteur par des anticorps (Finnemann et al., 1997; Miceli et al., 1997). D'ailleurs,  $\alpha\beta_5$  est la seule intégrine exprimée sur la surface apicale des cellules de l'EPR (Anderson et al., 1995; Finnemann et al., 1997). L'étude de la souris *intégrine  $\beta_5^{-/-}$*  en 2004 a permis de mieux comprendre le rôle de cette intégrine dans la rétine. Chez ces souris mutantes, le rythme de la phagocytose est absent dès le plus jeune âge, et pourtant les photorécepteurs sont fonctionnels jusqu'à 4 mois (Nandrot et al., 2004). Durant le reste de la journée, la phagocytose est plus importante comparée aux souris sauvages, ce qui pourrait expliquer la perte lente et progressive de la fonctionnalité des photorécepteurs observable à partir de l'âge de 6 mois. A 12 mois, les souris *intégrine  $\beta_5^{-/-}$*  présentent une forte

accumulation de lipofuscine dans les cellules d'EPR, démontrant une digestion incomplète des SEP, un des symptômes de la DMLA. En 2006, un second rôle dans la rétine a été découvert pour cette intégrine : elle permet le maintien de l'adhésion rétinienne (Nandrot et al., 2006). En effet les intégrines sont capables de lier de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire afin de promouvoir l'adhérence des cellules, la migration et la phagocytose. Cette équipe a également constaté que l'adhésion rétinienne est soumise à un rythme circadien : 1 pic d'adhésion intervient 3,5 heures après l'arrivée de la lumière soit 1,5 heures après le pic de phagocytose. Chez les souris *intégrine  $\beta_5^{-/-}$*  l'adhésion entre les photorécepteurs et les cellules d'EPR est significativement réduite tout au long de la journée sans être abolie. De plus, le rythme de l'adhésion rétinienne est moins soutenu chez ces souris comparé à celui présent chez les souris sauvages, cependant il est toujours présent, montrant également que l'intégrine n'est pas la seule protéine impliquée dans l'adhésion rétinienne et son rythme circadien. Il a fallu attendre 10 ans après la découverte de l'implication de l'intégrine  $\alpha\beta_5$  dans la phagocytose rétinienne pour que MFG-E8 soit identifié comme son ligand pour la liaison des SEP (Nandrot et al., 2007). MFG-E8 était un bon candidat depuis qu'il avait été identifié comme protéine pont entre l'intégrine  $\alpha\beta_3$  et les PtdSer chez les macrophages (Hanayama et al., 2002). De plus, son expression a été démontrée dans la rétine et dans l'EPR en 2006 (Burgess et al., 2006). Cependant, MFG-E8 ne semble pas être impliqué dans l'adhésion rétinienne (Nandrot et al., 2007).

L'intégrine  $\alpha\beta_5$  semble agir conjointement avec un autre récepteur, la tétraspanine, CD81, pour permettre la liaison des SEP (Chang, 2007). En effet, *in vitro* lorsque l'activité de CD81 est bloquée, la liaison des SEP est diminuée d'environ 35%. Son rôle n'est cependant pas encore élucidé, il pourrait réguler la disponibilité, le renouvellement et les protéines de liaison de l'intégrine  $\alpha\beta_5$ .

### **b) Signalisation intracellulaire de l'intégrine $\alpha\beta_5$**

La liaison entre l'intégrine et son ligand MFG-E8 permet le recrutement de plusieurs partenaires intracellulaires conduisant à des voies de signalisation différentes et indépendantes (Figure 10).

L'intégrine active la protéine de signalisation FAK (focal adhesion kinase) au niveau submembranaire. FAK est une tyrosine kinase cytoplasmique qui colocalise avec les intégrines, elles-mêmes dépourvues d'activité kinase, au niveau des contacts focaux. En 2003, l'expression de FAK a été identifiée au niveau de la membrane apicale des cellules d'EPR et

son état de phosphorylation, reflétant son activation, a été étudié *in vitro* (Finnemann, 2003). En l'absence de SEP, FAK est liée à l'intégrine  $\alpha\beta 5$  et est peu phosphorylée. Lors de la phase de liaison, FAK est toujours liée à l'intégrine  $\alpha\beta 5$  et sa phosphorylation augmente au niveau de la tyrosine 397. Pour enclencher la phase d'internalisation des SEP, FAK se détache de l'intégrine pour aller activer d'autres protéines de signalisation, et sa phosphorylation diminue progressivement. Durant cette phase l'activation de MerTK par phosphorylation de ses tyrosines est donc induite de façon indirecte par cette voie de signalisation intracellulaire. L'activation de MerTK est essentielle pour permettre l'internalisation des SEP (Finnemann, 2003). En 2004, l'activation de FAK et de MerTK a été étudiée *in vivo* au cours du rythme circadien (Nandrot et al., 2004). La phosphorylation de FAK et de MerTK se fait de façon séquentielle, 30 min et 2 heures après l'arrivée de la lumière respectivement (Figure 9, C). Cette découverte a permis de caractériser le lien moléculaire entre les deux premières étapes de la phagocytose : la liaison et l'internalisation des SEP dans la cellule de l'EPR.

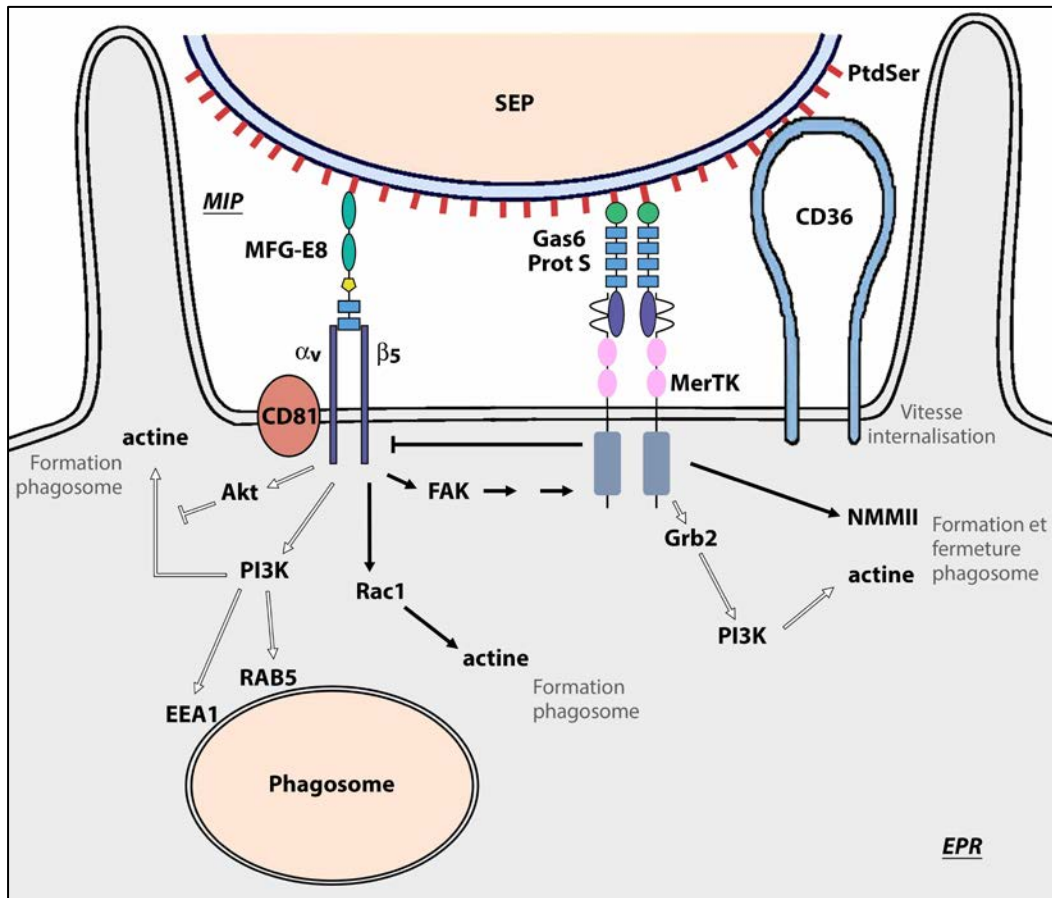
Le couple intégrine  $\alpha\beta 5$ -MFG-E8 est également impliqué dans la dynamique des filaments d'actine. En effet, en 2012, Mao et Finnemann ont montré que ce couple induit l'activation d'une autre protéine indépendamment de l'activation de FAK et de MerTK. Il s'agit de la protéine Rac1 qui appartient à la famille des protéines Rho GTPase (Mao and Finnemann, 2012). Lorsqu'elles sont liées à un GTP, ces protéines interagissent avec d'autres protéines impliquées dans l'assemblage des filaments d'actine qui sont essentiels à la formation de la coupe phagocytaire. La polymérisation de l'actine en filament s'effectue à partir de monomères d'actine, appelé actine globulaire, et de molécules d'ATP. La polymérisation de l'actine est contrôlée par des protéines de la famille des Rho GTPase (Cdc42, RhoA et Rac1) et par des lipides membranaires de type phospho-inositides (Deschamps et al., 2013). Les filaments d'actine sont essentiels pour de nombreuses fonctions cellulaires comme la motilité, la division et le transport cellulaires et la phagocytose (Burnside, 1976). Pour internaliser les particules, la membrane plasmique se déforme grâce à la polymérisation des filaments d'actine, formant des pseudopodes qui vont entourer la particule. Pour permettre l'allongement de ces pseudopodes, les filaments d'actine se dépolymérisent à la base de la coupe phagocytaire pour être de nouveau polymérisés à l'extrémité des pseudopodes. Ainsi l'englobement d'une particule à internaliser est organisé par une dynamique très précise et active de polymérisation et dépolymérisation des filaments d'actine. Cette dynamique a particulièrement bien été étudiée dans le processus de phagocytose des corps étrangers via le récepteur Fc gamma ( $Fc\gamma R$ ). La liaison des corps

étrangers à ce récepteur induit d'un côté l'activation de Cdc42 et l'accumulation de PIP2 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) qui activent en retour des effecteurs de la polymérisation de l'actine permettant la naissance de la coupe phagocytaire (Scott et al., 2005). En parallèle, cette liaison au FcγR induit l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K). La PI3K utilise le PIP2 qu'elle transforme en PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate) pour l'activation de Rac1, Rho GTPase essentielle pour l'extension complète des pseudopodes et la fermeture de la coupe phagocytaire (Niedergang and Chavrier, 2005). PIP3 est également responsable de l'inhibition de Cdc42. Ainsi l'inhibition de Cdc42 et la diminution de la quantité de PIP2 provoquent la dépolymérisation des filaments d'actine à la base de la coupe phagocytaire (Swanson, 2008).

Dans l'EPR, Cdc42, RhoA et Rac1 sont exprimées par l'EPR, cependant seule Rac1 semble impliquée dans l'internalisation des SEP (Mao and Finnemann, 2012). La liaison de MFG-E8 sur l'intégrine αvβ5 induit *in vitro* une redistribution et une activation de Rac1 (Mao and Finnemann, 2012). En effet, Rac1 est mobilisée au niveau des SEP et est liée à un GTP. Son activation permet la formation de filaments d'actine au niveau des particules liées par l'intégrine αvβ5. *In vivo*, l'absence de FAK ou de MerTK n'a pas d'incidence sur l'activation de Rac1 qui est soumise elle aussi à un rythme circadien. Son activation augmente 1 heure après l'arrivée de la lumière pendant l'étape de liaison des SEP, et redevient basale après le pic de phagocytose. La PI3K est également sollicitée dans l'EPR pour favoriser la polymérisation de l'actine au niveau des SEP liés (Bulloj et al., 2013).

Le mécanisme de fermeture de la coupe phagocytaire est encore mal connu. Cependant, elle semble être régulée par les Rho GTPase, qui activent la myosine non musculaire de type II (NMMII) (Niedergang and Chavrier, 2004). Dans l'EPR le recrutement de NMMII est sous la dépendance de MerTK (voir Chapitre III. 3) (Strick et al., 2009). Après l'internalisation des particules dans la cellule, les filaments d'actine semblent se dépolymériser rapidement (Niedergang and Chavrier, 2004). Dans les macrophages et dans l'EPR, les phagosomes migrent ensuite dans la cellule pour fusionner avec les lysosomes le long des microtubules (Jiang et al., 2015; Niedergang and Chavrier, 2004). Dans l'EPR, les phagosomes migrent tout d'abord le long des filaments d'actine grâce à la myosine VIIa afin de quitter les microvilli, puis ils sont ensuite pris en charge par les microtubules grâce à la kinésine-1 (Gibbs et al., 2003; Jiang et al., 2015). En effet, la perte de la myosine VIIa induit un retard dans la migration des phagosomes des microvilli de l'EPR vers le centre de la cellule, ces derniers sont coincés dans la partie apicale de l'EPR (Gibbs et al., 2003). La perte

de la kinésine-1 entraîne une plus grande quantité de phagosomes dans l'EPR après le pic de phagocytose (Jiang et al., 2015).



**Figure 10 : Les acteurs de la phagocytose rétinienne.**

Schéma représentant les différents récepteurs impliqués dans la phagocytose rétinienne et leurs voies de signalisation connues. L'intégrine  $\alpha_v\beta_5$  lie son ligand MFG-E8 lui-même lié aux phosphatidylsérines à la surface des SEP. Cette liaison permet le déclenchement de la phagocytose : l'activation de FAK va permettre l'activation intracellulaire de MerTK. L'intégrine recrute également de nombreuses protéines comme Rac1, PI3K et Akt. Ces protéines permettent la mobilisation du cytosquelette d'actine pour la formation du phagosome et son déplacement dans la cellule. MerTK activé et lié à ses ligands Gas6 et Protéine S interagit avec Grb2, qui stimule la PI3K pour la mobilisation du cytosquelette d'actine. MerTK interagit également avec NMMII qui permet la formation du phagosome. CD36 permettrait de moduler la vitesse d'internalisation. Les flèches noires représentent les voies de signalisation identifiées *in vivo*, tandis que les flèches évidées représentent les voies identifiées *in vitro* [Modifié d'après van der Meer et al., 2014, *Blood*].

### 3. L'identification de MerTK : un modèle historique, le rat RCS

L'étude d'un modèle naturel de rat, le Royal College of Surgeons (RCS), a permis de découvrir le deuxième récepteur important pour la phagocytose des SEP par l'EPR. Chez le rat RCS l'EPR lie les SEP mais ne les internalise pas, ce qui a pour conséquence leur accumulation dans l'espace sous-rétinien, conduisant ainsi à une dégénérescence des

photorécepteurs et à une perte de la vision (Bok and Hall, 1971; Dowling and Sidman, 1962; Goldman and O'Brien, 1978). La dégénérescence rétinienne de ces rats a été décrite pour la première fois en 1938 par Bourne et ses collègues, puis a été observée et caractérisée en 1962 par Dowling et Sidman sans identifier le mécanisme moléculaire à l'origine de ce phénotype (Bourne et al., 1938; Dowling and Sidman, 1962). Cette pathologie est très précoce avec une perte des photorécepteurs observable dès 22 jours après la naissance. Au 32<sup>ème</sup> jour post-natal la totalité des photorécepteurs a dégénéré et les rats sont aveugles. C'est en 2000 que deux équipes ont identifié la protéine responsable de cette dégénérescence rétinienne (D'Cruz et al., 2000; Nandrot et al., 2000). Il s'agit du récepteur MerTK qui a été démontré comme nécessaire à l'internalisation des SEP au cours de la phagocytose rétinienne. Les deux équipes ont utilisé une approche de cartographie génétique classique qui a permis l'identification d'une mutation dans le gène *MerTK* qui est absente chez les rats contrôles. Il s'agit d'une large délétion génomique qui affecte une partie du second exon de *MerTK* conduisant à l'absence totale de la protéine. Les techniques de restauration de phénotype sur ces rats ont permis de rétablir la capacité phagocytaire des cellules de l'EPR et de limiter la perte des photorécepteurs, confirmant le rôle de MerTK dans l'internalisation des SEP préalablement liés par l'intégrine  $\alpha\beta5$  (Feng et al., 2002; Tschernutter et al., 2005; Vollrath et al., 2001).

En 1999, avant la découverte du rôle de MerTK dans la phagocytose, une équipe a créé une lignée de souris dont la partie intracellulaire de MerTK est absente, appelant cette lignée Mer kinase dead (*Mer<sup>kd</sup>*) (Camenisch et al., 1999). Ces souris ont permis de montrer l'implication de MerTK dans différentes fonctions, son rôle dans la diminution de l'inflammation et dans la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (Camenisch et al., 1999; Scott et al., 2001). Le phénotype oculaire de ces souris est identique à celui des rats RCS, montrant l'importance de la partie intracellulaire de MerTK dans la phagocytose rétinienne (Duncan et al., 2003).

Suite à la découverte de l'implication de MerTK dans la phagocytose rétinienne et dans la pathologie du rat RCS, de nombreuses études ont été réalisées afin de comprendre le fonctionnement de ce récepteur et ses mécanismes de régulations (détaillés dans le Chapitre III). De plus, des mutations de *MERTK* ont été identifiées chez des patients atteints de pathologies visuelles.

### III. Le récepteur Mer Tyrosine Kinase (MerTK)

#### 1. Un récepteur de la famille TAM

##### a) Nomenclature, structure et expression

MerTK appartient à la grande famille des récepteurs tyrosine kinases (RTK) et à la sous-famille des récepteurs TAM qui comprend Tyro3, Axl et MerTK. Ces gènes ont été identifiés au début des années 1990, dans plusieurs espèces et par de nombreux chercheurs, générant ainsi une confusion générale quant à leur nomenclature (Tableau 1). Tyro3 a été découvert en 1987 dans des lignées cellulaires de cancers (Takahashi and Cooper, 1987). Le récepteur Axl fut identifié par O'Bryan et ses collègues en 1991 chez des patients souffrant d'une leucémie (O'Bryan et al., 1991). En 1992, le dernier membre de la famille a été identifié à partir d'un rétrovirus de poulet et nommé v-eyk (Jia et al., 1992). Au cours de la même année des chercheurs le rebaptisent c-mer pour son expression dans les monocytes, les cellules épithéliales et reproductrices (Graham et al., 1994). Aujourd'hui la nomenclature adoptée pour ces récepteurs est Tyro3, Axl et MerTK (ou Mer).

**Tableau 1 : Nomenclature des récepteurs TAM (Tyro3, Axl, MerTK).**

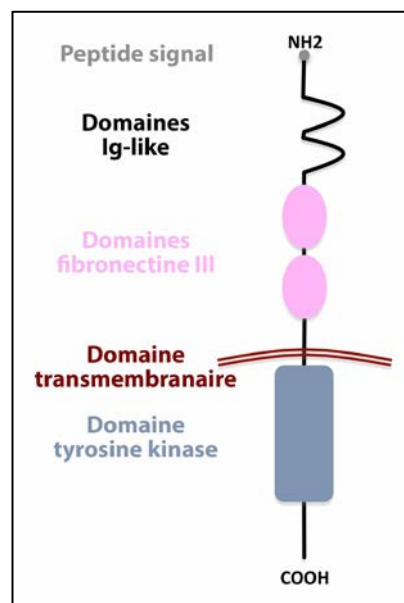
| Récepteurs | Synonymes  |
|------------|--|
| Tyro3      | Humain : Rse, Sky, Tif<br>Souris : Brt, Dtk, Etk-2<br>Poulet : Rek |
| Axl        | Humain : Ufo<br>Souris : Ark<br>Rat : Tyro7                        |
| Mer        | Humain : MerTK, Nyk<br>Rat : Tyro12<br>Poulet : Eyk                |

Les récepteurs TAM ont des structures génomiques similaires, composées de 20 exons pour *Tyro3* et *Axl* et 19 pour *Mertk*, codant pour des transcrits de 3 à 5 kilobases (kb). Les protéines n'ont pas le même nombre d'acides aminés, 890 pour Tyro3, 894 pour Axl et 999 pour MerTK (Graham et al., 1994; Weier et al., 1999). Elles présentent toutefois des séquences communes : il y a de 52 à 57% de similarité dans la partie extracellulaire et de 72 à 75% dans la partie cytoplasmique (Linger et al., 2008). Leur poids moléculaire élevé, compris entre 100 et 140 kiloDaltons (kDa) pour Tyro3 et Axl, et 165 et 205 kDa pour MerTK, dépend des modifications post-traductionnelles, glycosylations, phosphorylations et



ubiquitinations (Linger et al., 2008; Sather et al., 2007). Ces modifications peuvent être spécifiques du tissu, du type cellulaire et de l'espèce (Ling et al., 1996). Par exemple, chez la souris la taille de MerTK est plus importante dans les macrophages (205 kDa) que dans l'EPR (190 kDa) (Nandrot et al., 2004; Sather et al., 2007).

Comme tous les RTK, les récepteurs TAM contiennent un domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine kinase intracellulaire conservé riche en tyrosines. Les récepteurs TAM se distinguent des autres RTK par la séquence très conservée KW(I/L)A(I/L)ES présente dans le domaine kinase et par deux domaines constituant l'ectodomaine : deux domaines immunoglobulin-like (Ig-like 1 et 2), permettant la liaison des ligands, suivis de deux domaines fibronectine de type III (Figure 11) (Graham et al., 1994; Hafizi and Dahlbäck, 2006).



**Figure 11 : Schéma de la structure du récepteur MerTK.**

MerTK est un récepteur transmembranaire qui appartient à la grande famille des récepteurs à tyrosines kinases et à la sous-famille des récepteurs TAM (Tyro3, Axl et MerTK). Sa partie extracellulaire est composée d'un peptide signal permettant l'adressage de la protéine à la membrane, de deux domaines Ig-like et de deux domaines fibronectine III. MerTK possède également un domaine transmembranaire permettant son ancrage à la membrane plasmique. Sa partie intracellulaire est composée d'un large domaine tyrosine kinase contenant de nombreuses tyrosines phosphorylables et permettant l'ancrage de différentes protéines de signalisation cellulaire.

Au contraire des autres RTK, les récepteurs TAM ne sont pas requis au cours du développement. Chez l'adulte, les récepteurs TAM sont exprimés dans la plupart des tissus avec certains chevauchements mais un profil d'expression unique. Ils sont tous exprimés dans les organes reproducteurs, les reins et certaines cellules de la lignée hématopoïétique (incluant les monocytes/macrophages et les plaquettes) (Linger et al., 2008; Lu and Lemke, 2001; Lu et

al., 1999). Tyro3 est fortement exprimé dans le système nerveux central, tandis qu'Axl est abondant dans l'hippocampe et le cervelet (Linger et al., 2008). MerTK quant à lui est très présent dans les cellules dendritiques et les mégacaryocytes. Dans la rétine, seuls MerTK et Tyro3 sont exprimés (Prasad et al., 2006).

### **b) Activation et fonctions cellulaires**

En 1995, Stitt et ses collègues ont identifié deux ligands capable de lier et d'activer ces récepteurs TAM : Gas6 et Protéine S (Stitt et al., 1995). Toutefois l'activation d'Axl par la Protéine S n'a jamais été établie (Lew et al., 2014; Linger et al., 2008). Leur structure et leur mode de liaison aux récepteurs sont détaillés dans le Chapitre IV. La liaison de ces ligands aux récepteurs entraîne leur dimérisation suivie de l'autophosphorylation de résidus tyrosines dans le domaine cytoplasmique du récepteur (tyrosines 749, 753 et 754 pour le MERTK humain), activant des cascades de signalisation intracellulaire (Hafizi and Dahlbäck, 2006; Ling et al., 1996). Les 3 résidus tyrosines sont essentiels pour une activité complète de ces récepteurs. Cependant, il est intéressant de noter qu'une étude récente a montré que la liaison seule des ligands ne signifie pas l'activation optimale des récepteurs, en effet d'autres facteurs entrent en jeu tels que l'accrochage des ligands aux PtdSer et la présence d'ions calcium dans le milieu extracellulaire (Lew et al., 2014).

La stimulation des récepteurs TAM par leurs ligands produit diverses réactions cellulaires qui dépendent du ligand, du type cellulaire et de son environnement. Dans les macrophages, les récepteurs TAM sont impliqués dans la diminution de la réponse pro-inflammatoire médiée par les cytokines suite à une exposition à des bactéries, et dans la clairance des cellules apoptotiques avec une utilisation préférentielle de MerTK (Scott et al., 2001). En effet, il a été observé une abolition quasi complète de la phagocytose des cellules en apoptose par les macrophages n'exprimant pas MerTK (Seitz et al., 2007). L'absence d'expression des deux autres récepteurs diminue la clairance de seulement 50%. De plus, Tyro3 et Axl semblent être importants pour l'activation de MerTK, car en leur absence la phosphorylation de MerTK est fortement réduite chez les macrophages (Seitz et al., 2007). Dans ce processus de phagocytose, les macrophages utilisent l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  pour lier les cellules apoptotiques et MerTK pour leur internalisation (Dransfield et al., 2015; Wu et al., 2005). Dans les plaquettes, ils sont requis pour permettre l'agrégation plaquettaire (Angelillo-Scherrer et al., 2005). Ils possèdent également un rôle très important dans la spermatogenèse. En effet, les souris déficientes pour ces 3 récepteurs sont stériles en plus d'être aveugles (Lu

et al., 1999). Ils peuvent également jouer un rôle dans la survie cellulaire, la croissance, la différenciation, l'adhésion et la motilité.

Les récepteurs TAM appartenant à la grande famille des RTK, les mêmes mécanismes d'atténuation et de fin de signal pourraient être utilisés : l'hétéro-oligomérisation, des ligands antagonistes, la phosphorylation de résidus inhibiteurs, la déphosphorylation des résidus activateurs, l'endocytose des récepteurs et leur dégradation (Schlessinger, 2000). Ces récepteurs peuvent également être clivés, libérant ainsi leur ectodomaine dans le milieu extracellulaire (O'Bryan et al., 1995; Sather et al., 2007). Cette partie soluble est capable de lier Gas6 afin de bloquer sa liaison avec les récepteurs disponibles à la surface cellulaire (Budagian et al., 2005; Sather et al., 2007). Le mécanisme de clivage est détaillé dans la partie III. 4. b.

Les souris déficientes pour les 3 récepteurs se développent normalement mais sont atteintes de troubles physiologiques à l'âge adulte. Elles présentent des défauts du système immunitaire (défaut de clairance des cellules apoptotiques dans de multiples tissus, niveaux élevés de cytokines pro-inflammatoires comme le tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'interleukine 6 (IL-6) et production d'auto-anticorps), du système nerveux, du système reproducteur (défauts de spermatogenèse), et du système visuel (dégénérescence rétinienne) (Lemke and Lu, 2003). L'absence de Tyro3 seul provoque des désordres neurologiques et celle d'Axl une augmentation de la perméabilité et des défauts de remodelage vasculaires (Korshunov et al., 2006). Les souris déficientes pour *MerTK* présentent certaines similitudes phénotypiques avec les souris triple déficientes pour les récepteurs TAM. La perte de l'expression de *MerTK* engendre des maladies auto-immunes, des défauts de phagocytose des cellules apoptotiques et des pathologies visuelles (D'Cruz et al., 2000; Duncan et al., 2003; Nandrot et al., 2000; Scott et al., 2001). Les récepteurs TAM sont surexprimés dans une grande variété de cancers humains, associés à des pathologies agressives et une espérance de survie courte, avec la capacité d'activer les voies de signalisation oncogéniques et de survie cellulaire (Lemke, 2013; Linger et al., 2008). L'association entre les TAM et le cancer est connue depuis longtemps. Les premiers ADN complémentaires d'*AXL* et de *MERTK* ont été clonés à partir de patients atteints respectivement de leucémie et de lymphoblastome (Graham et al., 1994; O'Bryan et al., 1991).

## 2. Mutations du gène *MERTK* et pathologies associées

Depuis que MerTK a été identifié comme responsable du phénotype du rat RCS, le criblage génétique de nombreux patients a révélé la présence de mutations de *MERTK* dans des dégénérescences rétiniennes. Nous avons récemment publié une revue exhaustive des mutations de *MERTK* identifiées chez l'Homme (Parinot and Nandrot, 2015, *in press*) (Annexe 1).

La majorité de ces mutations ont été identifiées chez des patients provenant de familles consanguines et se transmettent selon un mode autosomal récessif. Les pathologies ont d'abord été décrites comme des rétinites pigmentaires (RP) (Gal et al., 2000). Cependant le phénotype semble atypique.

La RP se caractérise par une dégénérescence précoce des bâtonnets suivie plus tard au cours de la vie adulte par celle des cônes. Les dommages sur la macula ne sont visibles qu'à des stades avancés de la pathologie. Les patients avec des mutations sur *MERTK* présentent un phénotype plus sévère qu'une RP « classique », qui se développe très rapidement durant la première décennie de la vie avec une atteinte maculaire très précoce. De plus, certains patients présentent une autofluorescence au niveau de la macula, ce qui révèle une digestion incomplète des SEP par l'EPR, confirmant ainsi le défaut de phagocytose (Tschernutter et al., 2006). Au vu de ces caractéristiques uniques, il serait donc plus exact de qualifier ce phénotype de dystrophie de type bâtonnet-cône. Les mutations identifiées se distribuent dans tous les domaines de *MERTK*, cependant la plupart sont présentes dans le domaine tyrosine kinase de la protéine. Presque la moitié des mutations est à l'origine de protéines aberrantes et de nombreuses autres conduisent à des protéines tronquées.

Bien avant d'être identifié dans les pathologies rétiniennes chez l'Homme, *MERTK* a d'abord été caractérisé en 1994 comme un proto-oncogène (Graham et al., 1994). La surexpression de *MERTK* est d'ailleurs impliquée dans de nombreux cancers : leucémie, lymphome, cancers colorectal et gastrique (Linger et al., 2008; Watanabe et al., 2011). Certaines mutations ont également été identifiées dans des mélanomes, des myélomes multiples et des carcinomes (Huchtagowder et al., 2012; Tworkoski et al., 2013). L'expression de *MERTK* est également augmentée dans certaines pathologies non cancéreuses, comme la sclérose en plaque et l'athérosclérose (Hurtado et al., 2011; Weinger et al., 2009).

Récemment, plusieurs approches thérapeutiques ont été développées afin de restaurer l'expression de MerTK dans certains cancers et pathologies visuelles (Conlon et al., 2013; Linger et al., 2013). Depuis 2011, la phase I d'un essai clinique est en cours en Arabie Saoudite sur des patients atteints de dégénérescence rétinienne dues à des mutations de *MERTK* (clinicaltrials.gov; NCT01482195). Au vu de son implication dans de nombreuses pathologies visuelles et cancéreuses, du caractère rapide de l'évolution de ces pathologies et de leur impact sur la santé publique, il est essentiel d'étudier les voies de signalisation intracellulaires impliquant le récepteur MerTK et la régulation de son activité.

### 3. Activation rythmique et cascade de signalisation

Comme nous l'avons vu dans le Chapitre II. 2. b, MerTK est activé par phosphorylation rythmique dans la rétine (Figure 9, C) (Nandrot et al., 2004). *In vivo*, son activation est observable au moment du pic de phagocytose et est induite par FAK, elle-même activée rythmiquement par phosphorylation au moment de l'arrivée de la lumière via le couple récepteur-ligand  $\alpha\beta 5$ -MFG-E8. L'activation de FAK dure plus longtemps que celle de MerTK. En effet, une heure et demi après le pic de phagocytose, FAK présente toujours une forte phosphorylation (Nandrot et al., 2004). En 2005, Wu et ses collègues ont montré l'existence chez les macrophages d'une boucle de rétrocontrôle négative entre les deux récepteurs essentiels à la phagocytose, l'intégrine  $\alpha\beta 5$  et MerTK (Wu et al., 2005). *In vitro*, MerTK induit la phosphorylation de FAK sur la tyrosine 861 dans des cellules de fibroblastes transfectées. L'intégrine  $\alpha\beta 5$  recrute FAK ainsi phosphorylée, permettant l'activation de Rac1 pour la mobilisation des filaments d'actine. La liaison de Gas6 à MerTK semble essentielle pour induire la phosphorylation de FAK. Cette voie de signalisation pourrait expliquer la durée d'activation de FAK *in vivo* dans la rétine, bien que cette phosphorylation « en retour » n'ait jamais été établie dans les cellules d'EPR. Toutefois, en 2012 l'existence d'une boucle de rétrocontrôle entre MerTK et l'intégrine  $\alpha\beta 5$  a été démontrée dans les cellules d'EPR (Nandrot et al., 2012). *In vitro*, l'absence de MerTK dans les cellules d'EPR issues de rat RCS induit une plus grande quantité de SEP liés à leur surface par rapport à des cellules exprimant MerTK. Ces données suggèrent donc que MerTK permet de réguler la phagocytose rétinienne en restreignant la quantité de SEP pouvant être liés par l'intégrine  $\alpha\beta 5$ . Cependant, la cascade de signalisation en aval reste inconnue. MerTK pourrait réguler l'activité de l'intégrine indirectement en modulant par exemple des composants de la membrane liés à l'intégrine comme CD81 ou en modulant le cytosquelette sous-membranaire.

La signalisation intracellulaire de MerTK dans les cellules d'EPR *in vitro* a été partiellement décrite en 2013 par l'équipe du Dr Debra Thompson (Shelby et al., 2013). Cette équipe a identifié de nombreux partenaires cellulaires directs et/ou indirects permettant des cascades de signalisation différentes.

Dans un premier temps, MerTK semble capable de lier Grb2 dans la rétine, une protéine appartenant à la famille des GRB (growth factor receptor-bound proteins) (Shelby et al., 2013). Cette protéine se lie aux tyrosines phosphorylées de MerTK grâce à son domaine SH2 (Src Homology 2) et peut lier d'autres protéines grâce à ses deux domaines SH3. *In vitro*, la diminution de l'expression de Grb2 par siRNA, conduit à une diminution de 60% de l'internalisation des SEP, montrant l'importance de cette protéine dans l'activité phagocytaire des cellules d'EPR (Shelby et al., 2013). Une fois activée, Grb2 permet notamment l'activation de la sous-unité régulatrice  $\alpha$  de la PI3K, activant ainsi la voie de signalisation de PI3K/Akt qui est impliquée dans la survie cellulaire et la mobilisation du cytosquelette d'actine (Lemke, 2013). Shelby et ses collègues ont montré pour la première fois une interaction directe de MerTK avec la PI3K *in vitro* et avec des protéines natives de l'EPR (Shelby et al., 2013). La PI3K est impliquée dans la formation et la maturation des phagosomes chez les macrophages (Vieira et al., 2001). En effet, elle permet la synthèse de phosphoinositides qui recrutent des marqueurs du système endolysosomal dans les phagosomes nouvellement formés, tels que EEA1 (early endosomal antigen 1) et la GTPase RAB5. Dans les cellules d'EPR *in vitro*, chacune de ces trois protéines (PI3K, EEA1 et RAB5) colocalise avec les phagosomes, montrant leur implication dans le processus de phagocytose des SEP.

Dans un deuxième temps, ce groupe montre une interaction directe entre MerTK et Src, une tyrosine kinase intracellulaire, dont le rôle a été démontré dans la clairance des cellules apoptotiques par les cellules dendritiques (Yi et al., 2009). L'activation de Src par phosphorylation de la tyrosine 416 est dépendante de MerTK et est elle aussi rythmique. Elle n'est pas phosphorylée avant l'arrivée de la lumière, et l'est pendant le pic de phagocytose (Shelby et al., 2013). Le rôle de Src dans la phagocytose rétinienne n'est pas encore clairement établi. En effet, certaines études montrent que cette protéine serait impliquée dans la voie de signalisation MerTK–FAK–intégrine permettant l'activation de Rac1 et donc la mobilisation du cytosquelette d'actine (Wu et al., 2005). Cependant, dans les cellules d'EPR l'activation de Rac1 est indépendante de FAK et de MerTK, invalidant l'implication de Src dans cette voie de signalisation dans la rétine (Mao and Finnemann, 2012).

MerTK est également impliqué dans la formation du phagosome et plus particulièrement dans la fermeture de la coupe phagocytaire. En effet, Strick et ses collègues ont montré que MerTK interagit avec NMMII et participe ainsi à la formation du phagosome (Strick et al., 2009). Lors de la phase d'ingestion, la distribution cellulaire de NMMII est modifiée : initialement localisée au niveau des membranes latérales de l'EPR, elle est redistribuée au niveau des phagosomes en présence des SEP. Ce changement de localisation n'est pas observé dans l'EPR des rats RCS, montrant que la distribution de NMMII durant la phagocytose est dépendante de MerTK.

Contrairement aux macrophages qui phagocytent les cellules apoptotiques dès l'établissement d'un contact, les cellules d'EPR phagocytent les SEP à un moment spécifique alors que le contact est permanent. Dans la rétine, l'activation de la machinerie phagocytaire doit donc être parfaitement contrôlée afin de réaliser cette phagocytose au moment opportun et de la limiter dans le temps. Nous avons vu que MerTK est le récepteur essentiel pour effectuer l'internalisation des SEP. MerTK présente une activation rythmique très courte dans la rétine qui engendre de nombreuses voies de signalisations intracellulaires impliquées dans des processus très différents (Nandrot et al., 2004; Shelby et al., 2013). Afin de contrôler la durée du pic de phagocytose, son activité est régulée très précisément et pourrait l'être différemment de chez les macrophages.

## **4. Régulation extracellulaire de la fonction de MerTK**

### **a) Par ses ligands Gas6 et Protéine S**

Axl, Tyro3 et MerTK étaient considérés comme des récepteurs orphelins jusqu'en 1995, lorsque deux laboratoires indépendants ont identifié Gas6 comme capable de lier et d'activer Axl (Stitt et al., 1995; Varnum et al., 1995). Stitt et ses collègues ont également observé que Protéine S était responsable de la phosphorylation de Tyro3 (Stitt et al., 1995). Peu de temps après, Gas6 a été identifié comme capable de lier MerTK (Nagata et al., 1996).

Les interactions entre les récepteurs TAM et leurs ligands ont été bien étudiées par différentes équipes. Gas6 active les 3 récepteurs, tandis que Protéine S active uniquement MerTK et Tyro3 (Godowski et al., 1995; Lew et al., 2014). Gas6 lie directement le domaine extracellulaire des récepteurs TAM et stimule leur phosphorylation au niveau de leur domaine tyrosine kinase. L'affinité de Gas6 pour Axl est significativement plus élevée que celle pour Tyro3 et surtout MerTK (Chen et al., 1997; Nagata et al., 1996). Ces données suggèrent

qu'Axl serait le récepteur activé par Gas6 dans les tissus exprimant les 3 types de récepteurs TAM. L'association entre Gas6 et Axl a été particulièrement bien caractérisée : selon une stoechiométrie 2:2, Gas6 et Axl forment un complexe récepteur–ligand qui se dimérise avec un même autre complexe (Sasaki et al., 2006). La dimérisation active le récepteur par autophosphorylation des résidus tyrosines du domaine cytoplasmique, conduisant au recrutement de protéines de signalisation.

Protéine S, beaucoup moins étudiée, est capable d'activer MerTK pour permettre notamment la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages (Uehara and Shacter, 2008). Lorsque Protéine S se lie aux PtdSer, ses résidus cystéines s'oxydent, permettant ainsi la formation de dimères de ce ligand, et la liaison puis l'activation de MerTK (Uehara and Shacter, 2008).

En 1986, Mayerson et Hall montrent que la phagocytose des SEP par l'EPR nécessite la présence de sérum sans en identifier les molécules responsables (Mayerson and Hall, 1986). C'est en 2001, après la découverte des ligands des récepteurs TAM, que Hall montre qu'*in vitro* Gas6 est nécessaire à la phase d'internalisation de la phagocytose des SEP, suggérant ainsi qu'il agirait comme ligand de MerTK (Hall et al., 2001). Protéine S quant à elle ne semble pas nécessaire pour l'internalisation mais augmente la quantité de SEP liés à la surface des cellules d'EPR. Une autre équipe a également montré l'effet stimulateur de Gas6 sur des cellules d'EPR, et sa synthèse par cet épithélium (Karl et al., 2008). En 2002, Hall et ses collègues ont constaté que, pour initier l'internalisation, Gas6 doit subir une gamma carboxylation dépendante de la vitamine K et lier un atome de calcium afin de pouvoir lier les SEP et MerTK (Hall et al., 2002). Cependant, en absence totale de Protéine S l'internalisation des SEP est complètement abolie, alors que l'absence de Gas6 entraîne seulement une diminution de l'internalisation. En 2005 et 2006, deux études ont démontré l'absence de phénotype particulier au niveau de la rétine des souris déficientes pour *Gas6* par rapport aux souris contrôles (Hall et al., 2005; Prasad et al., 2006). La seconde équipe a également montré qu'*in situ* Protéine S est capable d'induire l'autophosphorylation de MerTK. En 2012, les souris double déficientes pour *Gas6* et *Protéine S* compliquent encore la compréhension du rôle de ces ligands (Burstyn-Cohen et al., 2012). En effet, ces souris présentent le même phénotype de dégénérescence rétinienne que les souris déficiente pour *MerTK*, alors que les souris simple déficientes pour un seul de ces ligands ne développent pas de phénotype particulier. L'ensemble de ces données suggère que chaque ligand seul est suffisant pour activer MerTK et stimuler la phagocytose des SEP dans la rétine, et que MerTK a



conjointement besoin de ces ligands pour permettre l'internalisation des SEP. Concrètement, nous ne savons toujours pas quel est le rôle respectif de chaque ligand, qui pourrait être différent dans la rétine *in vivo*.

### b) Par le clivage de son ectodomaine

Comme précisé précédemment, les récepteurs TAM appartiennent à la famille des RTK. Une des façons de réguler l'activité des RTK est le clivage de leur ectodomaine. En 1995, O'Bryan et ses collègues ont montré que la partie extracellulaire d'Axl peut être clivée libérant ainsi dans le milieu de culture une fraction soluble appelée sAxl (Axl soluble) (O'Bryan et al., 1995). Ce clivage semble être stimulé par la protéine kinase C (PKC) : en effet, sous l'action d'esters de phorbol activateurs de la PKC, il y a une augmentation de la quantité de sAxl dans le milieu de culture. Les parties transmembranaire et intracellulaire semblent rester à la membrane plasmique avec les résidus tyrosines toujours phosphorylés (O'Bryan et al., 1995). Le clivage d'Axl a été confirmé par une autre équipe qui a détecté la présence de sAxl dans le sérum et le plasma de souris (Costa et al., 1996). La fraction soluble semble être un inhibiteur compétitif du récepteur entier car elle est capable de lier le ligand et de le séquestrer, empêchant ainsi l'activation des récepteurs complets disponibles à la surface cellulaire (Rothlin et al., 2007). En 2005, Budagian et ses collègues ont montré qu'ADAM10 est responsable du clivage d'Axl, mais la publication de leurs résultats a ensuite subi une rétractation du fait de la manipulation de certaines portions de figures (Budagian et al., 2005). Le site de clivage d'Axl se trouve 14 acides aminés avant le domaine transmembranaire (Costa et al., 1996; O'Bryan et al., 1995). C'est en 2007 que le clivage a été démontré pour un deuxième membre de la famille TAM : MerTK (Sather et al., 2007). *In vitro* chez les macrophages, MerTK est clivé via la stimulation de la PKC et des lipopolysaccharides (LPS). La fraction soluble, sMerTK (MerTK soluble) est capable de lier le ligand de MerTK, Gas6. sMerTK est également capable d'inhiber la clairance des cellules apoptotiques et l'agrégation des plaquette *in vitro*, processus dans lesquels la protéine MerTK est impliquée. Cette équipe a également montré que le clivage de MerTK peut être inhibé par TAPI-0 (TNF $\alpha$  protease inhibitor-0), un inhibiteur non spécifique de certaines collagénases, gélatinases et métalloprotéinases. Ce n'est qu'en 2011 que la protéine responsable du clivage de MerTK dans les macrophages a été identifiée. En effet l'équipe du Dr Tabas a montré que les macrophages provenant de souris déficientes pour *ADAM17* sont incapables de cliver MerTK (Thorp et al., 2011). Les protéines de la famille ADAM sont nombreuses et certaines peuvent

partager les mêmes substrats. Parmi ces protéines, ADAM10 et 17 sont celles qui ont le plus de substrats en commun, cependant MerTK n'est pas clivé par ADAM10 dans les macrophages (Thorp et al., 2011). Dans cet article, ils identifient le site de clivage de MerTK au niveau de la proline 485 et de la sérine 486. Ils constatent également que le clivage de MerTK requiert l'activation de récepteurs Toll like (TLR), TLR3 et TLR4, et de la PKC $\delta$ . A ce jour, aucune donnée n'a identifié de clivage pour le troisième membre de la famille TAM, Tyro3.

Ainsi, dans la rétine, de nombreux acteurs concourant à la régulation de l'activité de MerTK restent encore à élucider. De plus, avant mes travaux de recherche, aucune donnée n'avait montré l'existence d'un clivage de MerTK au niveau des cellules d'EPR.

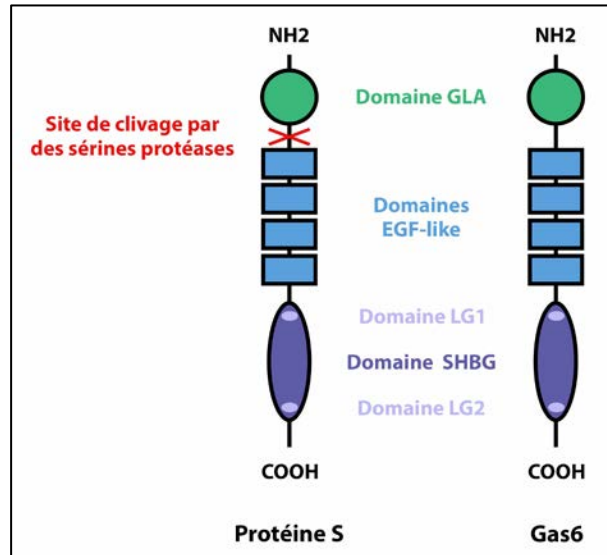
## IV. Les ligands de la matrice interphotorécepteurs

### 1. Protéine S et Gas6

#### a) Structure et expression

En 1977, Di Scipio et ses collègues découvrent la Protéine S et lui donnent ce nom en lien avec le lieu de sa découverte : Seattle (Di Scipio et al., 1977). Le gène de Protéine S appelé *PROS1* est situé sur le chromosome 3 humain et code pour un transcrit de 3,3 kb (Watkins et al., 1988). En 1993, dans des fibroblastes provenant d'embryons murins en état d'arrêt de croissance, une équipe identifie un homologue structural de Protéine S : Gas6 (Manfioletti et al., 1993). Ces deux protéines sont des glycoprotéines de masse moléculaire de 70 kDa pour Protéine S et de 75 kDa pour Gas6 (Benzakour et al., 2007; van der Meer et al., 2014). Elles sont constituées de plusieurs domaines : en N-terminal un domaine Gla riche en résidus d'acide glutamique qui permet la liaison aux PtdSer, suivi par 4 domaines EGF (epidermal growth factor-like) et un domaine SHBG (sex-hormon-binding globulin) en C-terminal (Figure 12). Le domaine SHBG est lui-même constitué de deux domaines laminine G requis pour la liaison aux récepteurs TAM (Benzakour et al., 2007; Dahlbäck, 2007; Sasaki et al., 2006). Gas6 possède 44% d'homologie de séquence avec Protéine S et leurs domaines structuraux sont très similaires (Manfioletti et al., 1993). Cependant Protéine S possède un site de clivage par les sérines protéases qui est absent chez Gas6 (van der Meer et al., 2014).

Ces deux protéines appartiennent à la super famille des protéines dépendantes de la vitamine K (PKVD). Les PKVD sont une famille de 14 membres qui peuvent être regroupés en 4 catégories selon leurs fonctions : i. les protéines du système de la coagulation sanguine regroupant les facteurs VII, IX, X, la protéine Z, la protéine C, la Protéine S et la prothrombine ; ii. la protéine Gas6 ; iii. les protéines intervenant dans la calcification (ostéocalcine et Gla-protéine de la matrice) ; et iv. des protéines transmembranaires dont la fonction est encore inconnue (PRGP1, PRGP2, TMG3 et TMG4) (Benzakour et al., 2007). Les PKVD sont produites et sécrétées dans le sang par le foie et les cellules endothéliales, et la plupart est impliquée dans la coagulation sanguine (Burstyn-Cohen et al., 2009; Fair and Marlar, 1986). Cependant, Protéine S et Gas6 sont synthétisées par d'autres organes tels que les macrophages, les cellules de Leydig, les ostéoblastes, les cellules musculaires lisses et la rétine (Benzakour and Kanthou, 2000; Burstyn-Cohen et al., 2012; Dahlbäck, 2007; Lemke and Rothlin, 2008; Prasad et al., 2006).



**Figure 12 : Schéma de la structure de Protéine S et de Gas6.**

Protéine S et Gas6 appartiennent à la famille des protéines dépendantes de la vitamine K. Elles possèdent 44% d'homologie et se composent d'un domaine GLA, permettant la liaison aux PtdSer, suivi par 4 domaines EGF-like et par un domaine SHBG, lui-même composé de deux domaines laminine G (LG1 et LG2). Les domaines LG permettent la liaison aux récepteurs TAM. Protéine S possède en plus un site de clivage par des sérines protéases [Modifié d'après Benzakour, 2007, *Med Sci.*].

#### **b) Régulation post-traductionnelle nécessaire à leur fonction**

La sécrétion et l'activité des PKVD sont dépendantes d'une réaction post-traductionnelle appelée la  $\gamma$ -carboxylation (Furie et al., 1999). La réaction a lieu dans le réticulum endoplasmique et s'effectue sur les résidus d'acide glutamique du domaine Gla de ces protéines. Elle consiste en la substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement carboxyle (COO-) sur le carbone gamma d'un acide glutamique, le transformant ainsi en acide  $\gamma$ -carboxyglutamique (Wallin and Hutson, 2004). L'enzyme qui catalyse cette réaction est la  $\gamma$ -glutamyl carboxylase et nécessite comme cofacteur la vitamine K (Benzakour et al., 2007; Suttie, 1980). La  $\gamma$ -carboxylation des résidus de ce domaine est directement liée à l'activité de ces protéines et leur confère la capacité de lier les PtdSer membranaires en présence de calcium.

#### **c) Rôle de la Protéine S dans la coagulation sanguine**

Le rôle de Protéine S dans la coagulation sanguine a été découvert en 1980 par Walker et ses collègues (Walker, 1980). Protéine S lie la Protéine C via son domaine Gla pour l'activer et dégrader les facteurs de la coagulation Va et VIIIa (Saller et al., 2005; Walker, 1984). Dans le sang, Protéine S est présente sous deux formes : une forme libre et une forme

liée à la C4b-binding protein (C4b-BP), une protéine régulatrice de la cascade d'activation du complément (Dahlbäck and Stenflo, 1981). Chez l'Homme Protéine S est présente en grande quantité dans le plasma à une concentration de 25 µg/mL (330 nM) (Griffin et al., 1992). Dans le plasma, la forme liée à C4b-BP est la forme majoritaire représentant 60 à 70% de la totalité de Protéine S (Griffin et al., 1992). Lorsque Protéine S est liée à C4b-BP, elle est « inactive » ne pouvant remplir son rôle anticoagulant (Dahlbäck, 1986). Ainsi C4b-BP permettrait de réguler aussi la coagulation de manière positive en séquestrant la Protéine S présente dans le plasma. Ce complexe Protéine S/C4b-BP n'est pas présent chez toutes les espèces ; la souris, le lapin et le bœuf ne possèdent pas le domaine de C4b-BP capable de lier la Protéine S (Rodríguez de Córdoba et al., 1994). Le clivage de Protéine S au niveau du domaine EGF-like 1 est une autre façon de réguler son activité anticoagulante. En effet, elle présente des sites de clivage pour la thrombine et le facteur Xa, inhibant ainsi sa liaison avec la Protéine C (Dahlbäck, 1986; Long et al., 1998). Jusqu'à présent aucun rôle pour Gas6 dans la coagulation sanguine n'a été identifié.

La découverte de la sécrétion de Protéine S par d'autres organes que le foie et les cellules endothéliales suggère un autre rôle pour cette protéine que celui dans la coagulation sanguine. Comme déjà précisé précédemment, Gas6 et Protéine S peuvent lier les récepteurs TAM via leur domaine SHBG, seules PKVD ayant cette capacité (Chen et al., 1997; Nagata et al., 1996; Sasaki et al., 2006; Stitt et al., 1995; Varnum et al., 1995).

#### **d) Rôles de Protéine S et de Gas6 avec les récepteurs TAM**

C'est en 2003 qu'un nouveau rôle pour Protéine S a été découvert. En effet, elle est nécessaire pour la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages (Anderson et al., 2003). En 2008, Uehara et Shacter étudient le mécanisme moléculaire et biochimique de la stimulation de la phagocytose par Protéine S (Uehara and Shacter, 2008). Dans un premier temps, Protéine S se lie aux PtdSer présentes à la surface des cellules apoptotiques, et subit alors une oligomérisation à travers l'oxydation de ses cystéines et la formation de ponts disulfides intermoléculaires. Suite à cette oligomérisation, Protéine S peut lier MerTK et l'activer en déclenchant son autophosphorylation (Uehara and Shacter, 2008). Gas6 est également capable de lier les PtdSer (Nakano et al., 1997), cependant son rôle dans l'élimination des cellules apoptotiques n'est pas clair. En effet, son absence n'entraîne pas de phénotype particulier et Protéine S est suffisante pour déclencher la phagocytose (Lew et al., 2014; Prasad et al., 2006). Il semble que MerTK soit le récepteur TAM préférentiellement

utilisé pour la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages (Seitz et al., 2007).

L'axe de signalisation Protéine S–TAM joue également un rôle important dans la régulation de l'inflammation en tant qu'inhibiteur (Suleiman et al., 2013). L'inflammation peut être déclenchée par les TLR exprimés à la surface des leucocytes (Sabroe et al., 2008). Les TLR détectent des pathogènes présents dans les milieux extracellulaires lors d'une infection et déclenchent une réponse rapide conduisant à la libération de cytokines inflammatoires (Arancibia et al., 2007; Berche, 2003). Les TLR inhibent la synthèse de Gas6 et Protéine S dans les macrophages (Deng et al., 2012). Les cytokines synthétisées suite à l'activation des TLR conduit à une réponse inflammatoire et à l'augmentation de synthèse d'Axl et à son activation (Rothlin et al., 2007). L'activation des récepteurs TAM avec leurs ligands Gas6 et Protéine S conduit à la synthèse de SOCS (suppressor of cytokine signaling), qui sont des protéines intracellulaires suppresseurs des TLR et des cytokines pro-inflammatoires (Rothlin et al., 2007). Ainsi les voies de signalisation des TLR et des récepteurs TAM se régulent entre elles afin de médier l'inflammation lors de la présence d'agents pathogènes.

Le récepteur TAM qui intervient pour la régulation de la réponse anti-inflammatoire des macrophages semble être MerTK. Chez les souris déficientes pour *MerTK*, un traitement aux LPS induit une augmentation de l'expression de TNF- $\alpha$ , absent chez les souris sauvages (Camenisch et al., 1999). Ces données montrent l'importance du récepteur MerTK dans la régulation de l'inflammation. Plusieurs études tendent à montrer que le ligand privilégié de MerTK pour inhiber l'inflammation est Protéine S (Suleiman et al., 2013). Protéine S inhibe l'activation des TLR dans les cellules dendritiques et inhibe l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL-6 et IL-1 en se liant aux récepteurs TAM (Deng et al., 2012). De plus, le LPS, ligand de TLR4, inhibe l'expression de Protéine S sans affecter l'expression des récepteurs TAM.

Très récemment l'équipe du Dr Benzakour a démontré l'implication de Protéine S et de MerTK dans l'homéostasie de la niche des cellules souches du cerveau au niveau de la zone subventriculaire. En effet, lors de la neuropoïèse dans cette zone, la moitié des cellules qui sont générées meurent par apoptose. Ils ont démontré que les cellules ayant un devenir neuronal ont la capacité de phagocyter ces cellules via l'axe de signalisation Protéine S–MerTK (Ginisty et al., 2015). Gas6 semble également impliqué dans l'homéostasie de cette niche. En effet, les souris déficientes pour *Gas6* présentent dans la zone subventriculaire du cerveau, une diminution de la prolifération et de la quantité des cellules souches (Gely-Pernot

et al., 2012).

Protéine S joue également un rôle dans le développement de l'athérosclérose. L'athérosclérose est une maladie inflammatoire multifactorielle. Elle est initiée par des processus inflammatoires dans la paroi des vaisseaux sanguins et une accumulation des LDL oxydés, engendrant une toxicité cellulaire et une réponse immunitaire importante (Laberge et al., 2005). Dans la paroi de ces vaisseaux sanguins, de nombreux macrophages et lymphocytes T sont présents mais incapables d'absorber la totalité des LDL oxydés, générant une masse croissante de cellules et de LDL qui peut à terme se détacher de la paroi vasculaire, provoquant ainsi des arrêts vasculaires cérébraux ou des arrêts cardiaques. Les LDL oxydés sont absorbés par les macrophages via le récepteur SR-A. En 2009, Liao et ses collègues montrent que Gas6 et Protéine S en se fixant sur MerTK, inhibent l'internalisation des LDL par les macrophages en diminuant l'expression de SR-A (Liao et al., 2009). Le couple Gas6/Protéine S–MerTK participe donc à l'initiation de l'athérosclérose en inhibant l'inflammation et en inhibant la phagocytose des LDL oxydés par les macrophages. Cependant dans des stades plus avancés de la pathologie, ce couple ligand–récepteur favorise l'élimination des cellules apoptotiques et diminue donc la formation des plaques de nécrose.

Selon plusieurs études, l'axe de signalisation Protéine S–TAM intervient dans la régulation de la vasculogenèse et de l'angiogenèse (revue de (Suleiman et al., 2013). Protéine S et Gas6 sont exprimés par les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, ces dernières exprimant également Axl (Fair and Marlar, 1986; Melaragno et al., 1999). Le phénotype des souris déficientes pour *Protéine S* est une coagulopathie embryonnaire létale, caractérisée par une dégénérescence vasculaire avec une interruption de la barrière hémato-encéphalique et des hémorragies cérébrales (Burstyn-Cohen et al., 2009; Saller et al., 2009). Les souris déficientes pour *Axl* développent le même phénotype au niveau du système vasculaire avec des défauts de perméabilité vasculaire, démontrant son rôle dans la vasculogenèse (Korshunov et al., 2006). Le récepteur VEGFR-2 favorisant l'angiogenèse est inhibé par le couple Gas6–Axl (Gallicchio et al., 2005). Plus récemment il a été découvert que la liaison de Protéine S sur MerTK et la voie de signalisation activée inhibe également l'angiogenèse induite par VEGF-A et son récepteur VEGFR-2 (Fraineau et al., 2012).

Protéine S semble également jouer un rôle dans la propagation du cancer (Suleiman et al., 2013). Depuis que les récepteurs TAM ont été identifiés dans le développement de divers cancers, de nombreuses études ont étudié l'implication de leurs deux ligands dans les cancers humains (Linger et al., 2008). Ainsi, la présence et l'activité de Protéine S ont été confirmées

dans de nombreux cas de cancers des poumons et de la thyroïde. En revanche Protéine S n'est que peu ou pas exprimée dans les mélanomes ou les cancers gastriques et pancréatiques (Suleiman et al., 2013).

Dans la rétine, Gas6 et Protéine S sont essentiels pour la survie des photorécepteurs. En effet les souris double déficientes pour ces ligands développent le même phénotype que les souris déficientes pour *MerTK* (Burstyn-Cohen et al., 2012). L'absence de l'un ou l'autre de ces ligands n'engendre pas de phénotype visuel suggérant une compensation mutuelle (Burstyn-Cohen et al., 2012; Prasad et al., 2006). Cependant leur rôle *in vivo* dans la phagocytose rétinienne reste encore à déterminer.

A l'origine, Protéine S a été identifiée comme une protéine intervenant seulement dans la cascade de la coagulation. Cependant avec la mise en évidence de sa fonction de ligand pour les récepteurs TAM, comme Gas6, de nouveaux rôles ont été caractérisés pour les deux protéines dans de nombreux tissus, pour la régulation de nombreuses fonctions et dans le développement de certaines pathologies. L'ensemble de ces découvertes rend compte de l'intérêt et de l'importance de Gas6 et Protéine S pour l'homéostasie de l'organisme.

## 2. MFG-E8

### a) Structure et expression

MFG-E8, aussi appelé lactadhérine, a été isolé pour la première fois à partir des globules gras du lait (Aoki et al., 1997; Oshima et al., 1999). Ces globules sont constitués de protéines et de triglycérides ancrés à la membrane qui poussent à partir de la surface apicale des glandes mammaires (Oshima et al., 2002). La protéine porte ce nom car elle possède des séquences similaires au domaine EGF et aux facteurs de la coagulation sanguine, les facteurs V et VIII (Hanayama et al., 2002). Cette protéine sécrétée est composée de plusieurs domaines : un peptide signal en N-terminal permettant sa sécrétion, suivi de deux domaines EGF-like (EGF1 et EGF2) et d'un domaine riche en proline et thréonine (Figure 13). La partie C-terminale de la protéine est composée de deux domaines discoïdine (C1 et C2) retrouvés dans les facteurs V et VIII impliqués dans la coagulation sanguine (Aziz et al., 2011). Elle possède une séquence arginine-glycine-asparagine (RGD) au sein du domaine EGF2 qui lui permet de lier les intégrines  $\alpha v \beta 3$  et  $\alpha v \beta 5$ , tandis que le domaine discoïdine permet la liaison des PtdSer (Hanayama et al., 2002). Deux isoformes de MFG-E8 existent : une forme longue (MFG-E8 L) et une forme courte (MFG-E8 c) (Burgess et al., 2006; Hanayama et al., 2002;



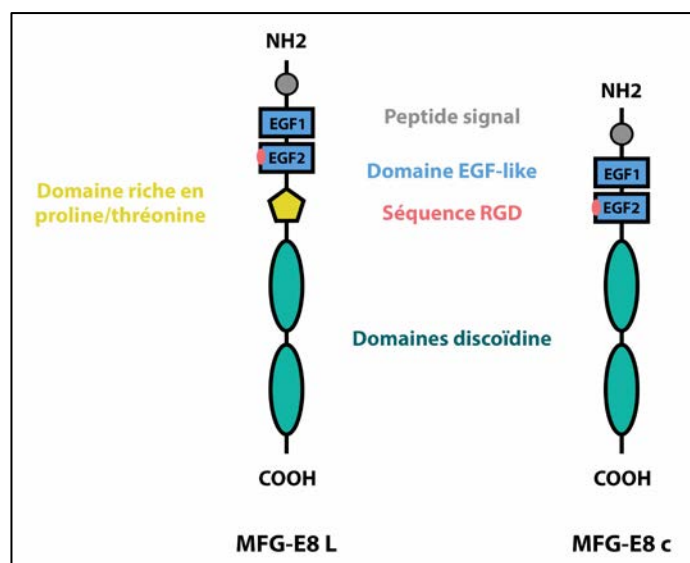
Oshima et al., 1999). La forme courte possède la même structure que la forme longue mais, suite à un épissage alternatif de son ARNm, l'exon 4 qui code pour le domaine riche en proline et thréonine est manquant (Aziz et al., 2011). MFG-E8 L possède 463 acides aminés et un poids moléculaire variant de 64 à 75 kDa. MFG-E8 c est composée de 426 acides aminés pour un poids moléculaire variant de 50 à 56 kDa. La variabilité de leur poids moléculaire s'explique par les nombreuses glycosylations qui diffèrent selon les tissus.

Son expression semble ubiquitaire, et est très abondante dans les glandes mammaires. MFG-E8 est présent dans les fluides des organes, tels que le cœur, les poumons, le foie, les reins, les intestins... (Aziz et al., 2011). Il est également exprimé par de nombreux types cellulaires : les cellules dendritiques immatures, les neurones, les astrocytes, la microglie, certains macrophages, les cellules musculaires lisses, des cellules épithéliales... (Hanayama et al., 2002). De manière générale la forme courte semble être la plus abondante (Aziz et al., 2011).

### b) Fonctions cellulaires

La première implication démontrée de MFG-E8 dans une fonction biologique a été la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. Ce ligand est produit et sécrété par des macrophages actifs (Hanayama et al., 2002). MFG-E8 ainsi libéré dans le milieu de culture est capable de lier les PtdSer présents à la surface des cellules apoptotiques via son domaine discoïdine d'une part, et d'autre part de lier via son motif RGD les intégrines  $\alpha\beta3$  présentes à la surface de ces mêmes macrophages. MFG-E8 n'est pas une simple molécule permettant de réaliser un pont entre deux cellules. Elle peut être considérée comme un ligand actif. En se liant à l'intégrine  $\alpha\beta5$ , elle induit son activation ce qui conduit à des cascades de signalisation intracellulaire (Akakura et al., 2004). Avec son implication dans la clairance des cellules apoptotiques, MFG-E8 possède également des propriétés anti-inflammatoires. La clairance permet de diminuer la synthèse des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  et certaines interleukines, tout en augmentant la synthèse des cytokines anti-inflammatoires (Aziz et al., 2011). *In vitro*, la présence de MFG-E8 dans le milieu de culture de macrophages en présence de LPS atténue la synthèse des cytokines pro-inflammatoires et augmente la clairance des cellules apoptotiques (Miksa et al., 2008). De plus, les souris déficientes pour *MFG-E8* semblent développer des maladies auto-immunes avec une augmentation de cellules apoptotiques dans les tissus (Hanayama et al., 2004). Son implication dans la réduction de l'inflammation pourrait être un effet indirect, car MFG-E8 liée à l'intégrine  $\alpha\beta3$  induit

l'activation de MerTK qui lui-même est impliqué dans la diminution de l'inflammation. MFG-E8 est également impliquée dans la cicatrisation des plaies, le remodelage artériel et l'angiogenèse (Aziz et al., 2015).



**Figure 13 : Schéma de la structure de MFG-E8.**

MFG-E8 est une protéine sécrétée, composée d'un peptide signal, de deux domaines EGF-like, suivis d'un domaine riche en proline et en thréonine et de deux domaines discoïdines. Le domaine EGF2 possède la séquence RGD qui permet la liaison de MFG-E8 aux intégrines. Les domaines discoïdines permettent la liaison aux phosphatidylsérines. Il existe deux isoformes de MFG-E8 résultant d'un épissage alternatif de l'ARNm, la forme longue (MFG-E8 L) et une forme courte (MFG-E8 c) qui ne possède pas la région riche en proline et en thréonine.

En 2006, Burgess et ses collègues ont étudié l'expression de MFG-E8 dans la rétine (Burgess et al., 2006). Les deux formes de MFG-E8 sont présentes dans les rétines de rat. MFG-E8c est présente dans l'EPR et dans les segments internes des photorécepteurs, tandis que MFG-E8L est exprimée uniquement par l'EPR. Suite à sa sécrétion par les photorécepteurs et/ou par l'EPR, MFG-E8 est présente dans la MIP. Son implication dans la phagocytose des SEP par l'EPR a été identifiée par ma directrice de thèse le Dr E. Nandrot et ses collègues en 2007. L'étude des souris déficientes en MFG-E8 actif a permis de montrer qu'il est essentiel pour maintenir la rythmicité de cette activité (Nandrot et al., 2007). L'adhésion rétinienne est réduite chez ces souris mais uniquement au moment du pic d'adhésion. Ces résultats montrent que l'intégrine  $\alpha\beta 5$  utilise MFG-E8 comme ligand unique pour la phagocytose des SEP, mais pour l'adhésion rétinienne elle requiert aussi un autre ligand non identifié à ce jour. Le MFG-E8 présent dans la MIP permet donc d'initier le rythme de la phagocytose. Le type cellulaire responsable de la sécrétion de MFG-E8 dans la MIP n'étant pas encore identifié, la question de qui des photorécepteurs ou de l'EPR initie ce rythme reste toujours en suspens.

## V. Les protéases de la famille ADAM

### 1. Vue d'ensemble de cette grande famille

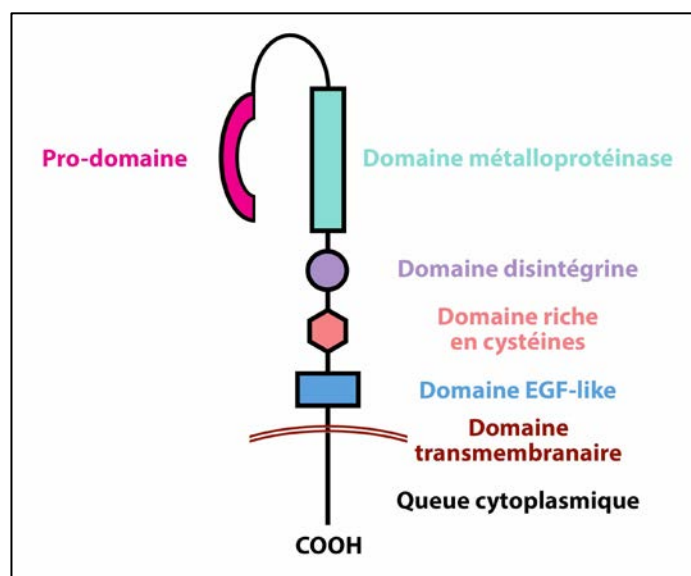
#### a) Domaines protéiques des ADAM

La famille ADAM comprend environ 35 membres dont 25 ont été décrits chez l'Homme : ADAM1-3, 5-12, 15, 17-23, 28-30, 32, 33 et ADAMDEC1 (Edwards et al., 2008). Les protéines de la famille ADAM appartiennent à la superfamille des protéases à zinc et à la sous-famille des metzincines. Elles possèdent à la fois un domaine métalloprotéase et un domaine disintégrine. C'est la présence de ces deux domaines qui leur confère le nom d'ADAM (a disintegrin and metalloprotease) et leurs fonctions : les ADAM peuvent agir comme des enzymes protéolytiques via le domaine métalloprotéase et comme des modulateurs de l'adhésion cellulaire via le domaine disintégrine. Les ADAM sont impliquées dans de nombreux processus comme les interactions et la migration cellulaires, la transduction de signaux, le clivage de protéines membranaires et la dégradation de la matrice extracellulaire (Okada et al., 2008).

Ces protéines transmembranaires possèdent 8 régions ou domaines : une séquence signal en N-terminal, un pro-domaine, un domaine métalloprotéase, un domaine disintégrine, une région riche en cystéines, un domaine EGF-like, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire en C-terminal (Figure 14) (Duffy et al., 2011). Toutefois des études génétiques réalisées chez l'Homme ont montré que certaines ADAM possèdent plusieurs variants issus d'un épissage alternatif (Shiomi et al., 2010). ADAM9-12 et 28 ont des isoformes qui ne contiennent ni la partie transmembranaire ni la queue cytoplasmique, formant ainsi des ADAM sécrétées (Gilpin et al., 1998; Hotoda et al., 2002; Howard et al., 2000; Yavari et al., 1998). Ces isoformes sécrétées présentent une activité protéolytique qui peut leur être propre comme c'est le cas pour ADAM9 et ADAM12 (Hotoda et al., 2002; Shi et al., 2000). ADAM15 et 22 possèdent également des variants d'épissage alternatif qui affectent les exons codant pour la partie cytoplasmique des protéines. Les isoformes d'ADAM15 ne contiennent pas les mêmes motifs dans la queue cytoplasmique, modifiant ainsi son affinité pour les protéines à domaine SH3 et permettant la liaison avec de nouveaux partenaires intracellulaires (Kleino et al., 2009). L'ensemble de ces données montre une diversification fonctionnelle entre les différentes ADAM et leurs isoformes.

La séquence signal en N-terminal permet l'adressage des ADAM à la membrane plasmique des cellules. Le pro-domaine des ADAM semble agir comme une protéine

chaperonne intracellulaire permettant de contrôler le bon repliement des protéines, empêchant ainsi leur dégradation et l'entrée dans la voie de sécrétion, les maintenant ainsi dans un état inactif (Edwards et al., 2008; Gonzales et al., 2004). En effet, les ADAM sont synthétisées sous la forme de pro-enzymes. Le maintien de cet état inactif est assuré par un mécanisme de « *cysteine switch* » qui correspond à l'interaction entre une cystéine du pro-domaine et un atome de zinc du site catalytique (Seals and Courtneidge, 2003). La rupture de cette interaction entraîne l'activation des ADAM et est assurée par la protéolyse du pro-domaine par des convertases de pro-protéines ou par auto-catalyse comme pour ADAM28 (Howard et al., 2000; Loechel et al., 1999; Lum et al., 1998; Schlöndorff et al., 2000).



**Figure 14 : Schéma de la structure des ADAM.**

Les ADAM sont des protéines transmembranaires appartenant à la grande famille des protéases à zinc. Leur partie extracellulaire est constituée d'un domaine métalloprotéase, responsable du clivage de molécules, d'un domaine disintégrine, permettant la liaison aux intégrines, d'un domaine riche en cystéines et d'un domaine EGF-like. Le domaine métalloprotéase est inactif en présence du pro-domaine qui est nécessaire pour le bon repliement des ADAM. La queue cytoplasmique des ADAM serait impliquée dans de nombreuses fonctions qui diffèrent selon l'ADAM : contrôle de la maturation protéique de l'ADAM, régulation de l'activité métalloprotéasique et liaison à des protéines intracellulaires.

Le domaine métalloprotéase assure la fonction majeure des ADAM. Il est responsable du clivage de l'ectodomaine de molécules présentes dans la matrice extracellulaire incluant des récepteurs, des facteurs de croissance, des cytokines et chémokines, et autres molécules participant au microenvironnement tissulaire (Shiomi et al., 2010). Ce site actif contient un atome de zinc et est coordonné par 3 histidines conservées et une méthionine. La séquence consensus active est : HExxHxxGxxH. Ainsi, en se basant sur leurs séquences et leurs structures, 12 ADAM humaines seraient capables d'activité protéolytique. A ce jour, seule

l'activité des ADAM8-12, 15, 17, 28 et 33 a été démontrée (Dreymueller et al., 2015). Les ADAM10 et 17 sont les plus étudiées au regard de leur activité protéolytique (voir Chapitre V. 2. b et c). Les ADAM ne possédant pas de domaine métalloprotéase actif sont impliquées dans l'adhésion de molécules grâce à leur domaine disintégrine.

Le domaine disintégrine confère aux protéines la capacité de lier les intégrines (Seals and Courtneidge, 2003). Classiquement cette liaison est assurée par la séquence RGD, cependant cette séquence n'existe que dans l'ADAM15 humaine (Eto et al., 2002). Pourtant, de nombreuses interactions ADAM-intégrines ont été découvertes, comme par exemple ADAM9 avec les intégrines  $\alpha 6 \beta 1$  et  $\alpha v \beta 5$ , ADAM15 avec  $\alpha 5 \beta 1$  et  $\alpha v \beta 3$ , et les ADAM1-3, 9, 12 et 15 avec l'intégrine  $\alpha 9 \beta 1$  via le motif  $RX_6DLPEF$  (Bax et al., 2004; Eto et al., 2002; Zhou et al., 2001). Cette séquence qui semble être conservée pour la plupart des ADAM n'est pas présente chez ADAM10 ou 17. Cependant, ces deux ADAM sont capables de lier des intégrines sans que les motifs requis n'aient été identifiés (Bax et al., 2004; Jones et al., 2013).

Les rôles de la région riche en cystéines et du domaine EGF-like restent encore à élucider. Toutefois, certaines études suggèrent que dans la plupart des ADAM la région riche en cystéines serait impliquée dans la régulation de leur activité et dans la spécificité de la reconnaissance du substrat (Duffy et al., 2011; Seals and Courtneidge, 2003).

La queue cytoplasmique des ADAM est très variable dans sa longueur et sa séquence. Ce domaine pourrait être impliqué dans la régulation de l'activité métalloprotéasique en réponse à un événement intracellulaire, et il pourrait lier des protéines différentes selon l'engagement de l'ectodomaine envers un substrat ou envers une molécule d'adhésion (Edwards et al., 2008). Il peut également contribuer au contrôle de la maturation et de la localisation cellulaire des ADAM (Seals and Courtneidge, 2003). En effet, en 2002 Cao et ses collègues ont montré que l'altération du domaine cytoplasmique d'ADAM12 modifie son transport vers la surface cellulaire (Cao et al., 2002). Les motifs riches en prolines sont les plus communs et permettent la liaison aux protéines à domaine SH3 (Seals and Courtneidge, 2003). Ces sites sont présents chez les ADAM7-10, 12, 15, 17, 19, 22, 29 et 33 (Edwards et al., 2008). On note également la présence de résidus sérines, thréonines et tyrosines qui sont phosphorylables par des kinases et qui pourraient permettre la liaison aux protéines à domaine SH2 (Seals and Courtneidge, 2003). En ce qui concerne ADAM17, la phosphorylation de la thréonine 735 par Erk est nécessaire pour son transport du réticulum endoplasmique à la surface cellulaire (Soond et al., 2005).

## b) Lieux d'action et expression cellulaire

La synthèse protéique des ADAM a lieu dans le réticulum endoplasmique. Leur maturation, c'est à dire le clivage de leur pro-domaine pour leur permettre de devenir active, a lieu dans le Golgi tardif pour la plupart des membres de la famille. Suite aux nombreuses études menées sur les ADAM il apparaît que la majorité des protéines ADAM sont exprimées à l'intérieur de la cellule, dans une région proche du noyau comme c'est le cas pour ADAM10, 15 et 17 (Dallas et al., 1999; Lum et al., 1998; Schlöndorff et al., 2000). Cette rétention des protéines ADAM dans la cellule pourrait être liée à leur partie cytoplasmique. En effet, pour ADAM12 seul le variant ADAM12-L est séquestré dans la cellule, le variant ADAM12-S qui ne possède pas la partie cytoplasmique est en permanence sécrété (Hougaard et al., 2000).

Certaines ADAM peuvent être actives dans la cellule comme c'est le cas pour ADAM10, 17 et 19 (Seals and Courtneidge, 2003). D'autres comme ADAM10 et 15 peuvent exister sous la forme de pro-enzyme à la surface cellulaire. En effet, même clivé le pro-domaine d'ADAM15 peut rester fixé à la forme mature de la protéine, la maintenant à l'état inactif (Lum et al., 1998). En ce qui concerne ADAM10, c'est un autre procédé qui intervient : son pro-domaine, une fois clivé, peut être sécrété par la cellule et se fixer à la forme mature d'ADAM10 pour l'inhiber (Anders et al., 2001). ADAM28 présente encore un autre mode de maturation : son pro-domaine est clivé une fois que la protéine est présente à la surface cellulaire (Schlöndorff et al., 2000).

Les différences observées au niveau de la localisation cellulaire et de l'activité des ADAM peuvent dépendre du type de cellule, de l'ADAM et du substrat impliqué. Le profil d'expression des ADAM varie considérablement. Les ADAM2, 7, 18, 20-21 et 29-30 sont exclusivement ou majoritairement exprimées dans les testicules et/ou les structures associées, leur conférant un rôle important dans la fertilisation. Les autres ADAM ont un profil d'expression plus hétérogène dans les tissus somatiques (Seals and Courtneidge, 2003).

Afin de comprendre les rôles individuels de chaque ADAM, de nombreuses souris déficientes pour une ou plusieurs de ces ADAM ont été générées. Seules les souris déficientes pour ADAM10 ou 17 présentent un phénotype sévère avec une mortalité embryonnaire (Hartmann et al., 2002; Peschon et al., 1998). Un mutant naturel d'ADAM17 avec une activité réduite de la protéase permet la survie des animaux jusqu'à l'âge adulte (Hassemer et al., 2010). Pour les autres ADAM, leur absence ou mutation dans l'organisme des souris ne semble pas engendrer de pathologies visibles (Edwards et al., 2008).

## 2. Activités protéolytiques des ADAM

### a) ADAM9

*In vitro*, plusieurs rôles pour ADAM9 ont été démontrés. Elle participe à l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire en se liant avec plusieurs intégrines (Zhou et al., 2001). Elle intervient également dans le clivage de nombreuses protéines qu'elle partage avec d'autres ADAM. Comme ADAM17, ADAM9 est capable de cliver le pro-HB-EGF (pro-heparin binding epidermal growth factor) (Izumi et al., 1998). *In vivo* ADAM9 clive ADAM10, libérant ainsi son ectodomaine et inhibant sa fonction protéolytique. ADAM10 étant impliquée dans le clivage neuroprotecteur du précurseur de l'amyloïde beta (APP), en inhibant sa fonction, ADAM9 pourrait participer au développement de la maladie d'Alzheimer (Cissé et al., 2005; Moss et al., 2011; Tousseyn et al., 2009)

ADAM9 possède de nombreux autres substrats décrits par Edwards et ses collègues (Edwards et al., 2008). Comme la majorité des ADAM, ADAM9 est aussi impliquée dans de nombreux cancers (Duffy et al., 2009).

Toutefois, ces derniers rôles n'ont jamais été démontrés *in vivo*. En effet, les souris *ADAM9*<sup>-/-</sup> générées par Weskamp et ses collègues en 2002 ne montrent pas de changement morphologique, ni de défaut histopathologique durant le développement ou chez l'adulte (Weskamp et al., 2002). Cette absence de phénotype pathologique pourrait être due à la compensation et/ou à la redondance fonctionnelle des autres membres de la famille ADAM. C'est en 2009 que, pour la première fois, un rôle physiologique d'ADAM9 est montré. Parry et ses collègues ont montré que les souris *ADAM9*<sup>-/-</sup> développent une dégénérescence de la rétine (Parry et al., 2009). En effet chez les souris âgées de 12 mois, ils observent des vésicules dans l'EPR et une perte de contact entre l'EPR et les SEP. A 20 mois la couche des noyaux des photorécepteurs est considérablement amincie par rapport aux souris contrôles. Ils notent la présence de macrophages dans la MIP et des dépôts ressemblant à des drusens entre l'EPR et la membrane de Bruch. Les souris présentent également un défaut d'adhésion entre la rétine et l'EPR. Très récemment des mutations sur le gène *ADAM9* ont été identifiées chez des patients présentant des dystrophies rétinienne (El-Haig et al., 2014; Goldstein et al., 2010; Hull et al., 2015).

## b) ADAM10

En 1997, Pan et Rubin ont découvert l'implication d'ADAM10 dans la libération d'une forme soluble de Delta qui est un ligand de Notch (Pan and Rubin, 1997). Notch est un récepteur de surface qui décide du devenir des cellules au cours de la neurogenèse (Primakoff and Myles, 2000). Cette voie de signalisation est très importante pour le développement du système nerveux central.

Deux ans après cette découverte, Lammich et ses collègues ont identifié un autre substrat pour ADAM10 : l'APP (Lammich et al., 1999). Le clivage de l'APP par ADAM10 est neuroprotecteur, empêchant ainsi le développement de la maladie d'Alzheimer (Postina et al., 2004). En clivant ADAM10, ADAM9 et 15 le rendent inactif, favorisant donc le développement de cette pathologie (Moss et al., 2011; Tousseyn et al., 2009).

En 2002, Hartmann et ses collègues ont généré la souris déficiente pour *ADAM10* afin de mieux comprendre son rôle dans le clivage de l'APP (Hartmann et al., 2002). Les embryons meurent précocément au cours de l'embryogenèse (à 9,5 jours) et présentent de graves anomalies du système neural et cardiovasculaire. En effet, la fusion du tube neural, la formation des somites, du cerveau et du cœur sont perturbés ou retardés chez ces souris. Ce phénotype est semblable à celui des souris déficientes pour la voie de signalisation de Notch. De plus, l'expression de certains gènes impliqués dans cette voie de signalisation est perturbée. Étrangement le clivage de l'APP est maintenu chez ces souris, suggérant que d'autres protéases sont capables de prendre le relais, comme ADAM17 qui peut cliver l'APP *in vitro* (Buxbaum et al., 1998).

ADAM9 et ADAM15 clivent ADAM10 au niveau extracellulaire (Tousseyn et al., 2009). Le clivage par ADAM9 mais pas par ADAM15 engendre un deuxième clivage d'ADAM10 au niveau de sa partie transmembranaire. Ceci entraîne la libération de la partie intracellulaire d'ADAM10 dans le cytoplasme qui entre ensuite dans le noyau afin de réguler la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire. Chez les souris déficientes pour *ADAM9* et *15*, le clivage de l'ectodomaine d'ADAM10 persiste dans certains tissus comme le foie et les poumons montrant l'implication d'autres protéases dans ce mécanisme pour certains tissus (Tousseyn et al., 2009).

De nombreux autres substrats d'ADAM10 ont été découverts au cours des années 2000 (Edwards et al., 2008). Parmi ces cibles, on retrouve Axl, un récepteur de la même famille que MerTK (Budagian et al., 2005).



### c) ADAM17 : une enzyme versatile

ADAM17, aussi appelée TACE pour TNF- $\alpha$  converting enzyme, a été la première protéase de la famille à être identifiée en 1997 par deux équipes comme responsable de la libération de TNF- $\alpha$  (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pro-inflammatoire synthétisée par les cellules immunitaires en réponse à la présence de corps étrangers. Elle existe sous deux formes. Une forme précurseur ancrée dans la membrane plasmique et une forme soluble qui est générée par le clivage de l'ectodomaine du précurseur par ADAM17. Cette découverte a permis de mettre en évidence l'activité catalytique des ADAM. Le clivage de ce précurseur pourrait intervenir au niveau des radeaux lipidiques (« lipid rafts ») de la membrane plasmique. En effet, Tellier et ses collègues ont montré que la forme mature d'ADAM17, ainsi que nombre de ses substrats dont le TNF- $\alpha$ , sont fortement exprimés dans ces radeaux lipidiques (Tellier et al., 2006). En 1998, la création de souris non fonctionnelles pour l'activité protéolytique d'ADAM17 a confirmé le rôle d'ADAM17 dans le clivage de TNF- $\alpha$  *in vivo* (Peschon et al., 1998). Ces souris meurent au cours du développement embryonnaire (à 17,5 jours) ou juste après la naissance. Elles possèdent de petites vibrisses et ont les paupières ouvertes (défaut de fusion des paupières). Ce phénotype est similaire aux souris déficientes pour TNF- $\alpha$ . Le clivage de TNF- $\alpha$  a été diminué de 95%, faisant donc d'ADAM17 la protéase responsable de son clivage *in vivo*. De plus, ces souris présentent des défauts de maturation et d'organisation épithéliale, responsables de problèmes digestifs, respiratoires et hormonaux.

ADAM17 est capable de cliver une multitude de substrats. En 2011, Scheller et ses collègues ont recensé plus de 77 substrats pour ADAM17 (Scheller et al., 2011). Ceux-ci peuvent être des protéines impliquées dans le système immunitaire comme le TNF- $\alpha$ , le récepteur soluble de l'interleukine 6 (IL6R) et la L-sélectine, des facteurs de croissance comme le pro-TGF $\alpha$  le pro-HB-EGF, la pro-amphiréguline, et la pro-épiréguline, montrant ainsi son rôle dans l'embryogenèse et le développement des tumeurs (Shiomi et al., 2010). Elle clive également des molécules d'adhésion comme ICAM-1, VCAM-1, et d'autres molécules comme l'APP intervenant dans la pathologie d'Alzheimer (Buxbaum et al., 1998; Scheller et al., 2011; Slack et al., 2001).

Plus récemment, l'équipe du professeur Ira Tabas a découvert en 2011 un nouveau substrat pour ADAM17 dans les macrophages (Thorp et al., 2011). Il s'agit du récepteur

membranaire MerTK. Ce clivage permettrait de supprimer la fonction anti-inflammatoire de MerTK en limitant la phagocytose des bactéries par les macrophages.

Les souris porteuses de mutations dans la séquence codant pour le domaine protéolytique d'ADAM17 voient certains de ses substrats toujours clivés. C'est le cas pour le pro-HB-EGF qui peut être clivé par ADAM9, et du TNF- $\alpha$  qui peut être libéré par ADAM10 (Primakoff and Myles, 2000; Reddy et al., 2000). En effet, ADAM10 et ADAM17 présentent 50% d'homologie de séquence dans leur domaine métalloprotéasique, ce qui peut expliquer le partage de nombreux substrats entre ces deux ADAM, comme l'APP, Delta et TNF- $\alpha$  (Gooz, 2010; Pruessmeyer and Ludwig, 2009). Ces deux protéases sont donc neuroprotectrices pour leur rôle de clivage de l'APP, bien qu'ADAM10 semble plus pertinente dans cette fonction (Shukla et al., 2015). TNF- $\alpha$  semble être clivé par ADAM10 et/ou ADAM17 en fonction du type cellulaire. Dans les macrophages issus de souris et une lignée de chondrocytes ostéoarthritiques humains, ADAM17 est la protéase majoritaire pour le clivage du TNF- $\alpha$ , tandis que dans les cellules humaines de rein et les cellules vasculaires endothéliales, ADAM10 et 17 se partagent le clivage (Hikita et al., 2009). Cependant, il est intéressant de noter qu'ADAM10 et 17 peuvent aussi avoir des rôles opposés. En effet, dans les cellules endothéliales rétinienne l'angiogenèse est réprimée par ADAM10 qui module positivement la signalisation de Notch, tandis qu'elle est stimulée par ADAM17 via une autre voie de signalisation que celle de Notch (Caolo et al., 2015).

### 3. Régulation de l'activité des ADAM

Nous avons vu que l'activité des ADAM peut être régulée par le clivage de leur pro-domaine, par les différentes isoformes existantes et par les différentes phosphorylations possibles au niveau de leur domaine cytoplasmique. Il existe également des inhibiteurs physiologiques des ADAM : les TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinases), qui existent sous 4 isoformes. TIMP-3 inhibe l'activité d'ADAM10, 12, 17, 28 et 33. TIMP-1, TIMP-2 et TIMP-4 inhibent l'activité d'ADAM10, 17, 28 et 33. ADAM8, 9 et 19 ne sont pas inhibées par les membres de la famille TIMP (Shiomi et al., 2010). ADAM10 est également inhibée par RECK (reversion-inducing, cysteine-rich protein with Kazal motif). Les TIMP sont également capables de réguler l'activité des MMP (matrix metalloproteinases). Ces inhibiteurs ont été utilisés de façon intensive pour caractériser le type de protéase responsable d'un type de clivage donné.

## PROJET DE THESE

L'EPR assure de nombreuses fonctions cruciales pour la viabilité et la fonctionnalité des photorécepteurs. Parmi ces fonctions, l'EPR élimine par phagocytose les SEP, portions des photorécepteurs soumises à un stress oxydatif intense et qui sont renouvelées en permanence. Cette phagocytose suit un rythme circadien et est réalisée par deux récepteurs principaux, l'intégrine  $\alpha\beta5$  qui lie les SEP et synchronise la phagocytose, et MerTK qui est requis pour l'internalisation des SEP dans l'EPR. Des mutations du gène *MERTK* provoquent des dystrophies bâtonnets-cônes assez sévères et une accumulation de dérivés de SEP non digérés, révélant un défaut de phagocytose par l'EPR. Malgré l'importance cruciale de MerTK pour la vision, la régulation de son activité dans la rétine n'est pas encore claire. La machinerie de cette phagocytose rétinienne est semblable à celle utilisée par les macrophages pour éliminer les cellules apoptotiques. Le récepteur MerTK, impliqué dans le processus d'internalisation dans l'EPR et les macrophages, est activé de manière similaire dans les deux types cellulaires : en intracellulaire par l'intégrine  $\alpha\beta5$  dans la rétine et  $\alpha\beta3$  chez le macrophage, et en extracellulaire par ses ligands, Gas6 et Protéine S. Dans les macrophages l'activité de MerTK est également régulée par le clivage de son ectodomaine par ADAM17 permettant la libération d'une forme soluble dans la matrice extracellulaire. En dépit de ces ressemblances, des différences existent entre les deux types de phagocytose. En effet, contrairement à la phagocytose réalisée par les macrophages, le contact est permanent entre les SEP et l'EPR et la phagocytose n'a lieu qu'une fois par jour. Ceci suggère que la régulation de la phagocytose, et donc du récepteur d'internalisation MerTK, doivent être très fines et peuvent être différentes de celles des macrophages.

Durant mon Doctorat, je me suis intéressée aux régulations extracellulaires de l'activité de MerTK dans la rétine par l'action de ses ligands et de son clivage.

La première partie de mes résultats présente notre étude qui a permis de mettre en évidence pour la première fois le clivage de MerTK au cours de la phagocytose rétinienne, et cela par approche *in vitro* dans la lignée cellulaire d'EPR de rat RPE-J et *in vivo* chez la souris. De plus, nous avons analysé le rôle de différentes doses des ligand Gas6 et Protéine S sur le clivage de MerTK *in vitro* durant la phagocytose. L'article présentant ces données, que je signe en co-premier auteur, a été publié dans le *Journal of Biological Chemistry* en février 2015.

La deuxième partie de mes résultats présente nos données sur l'étude de l'expression des deux ligands de MerTK dans la rétine au cours du rythme circadien et de leurs sites de fixation sur MerTK. Cette partie fait l'objet d'un manuscrit en cours de préparation pour soumission au *Journal of the European Molecular Biology Organization* sur lequel je serai premier auteur.

La troisième partie développe des travaux qui sont toujours en cours. Il s'agit de l'étude des protéases susceptibles de cliver MerTK. Nous avons étudié plusieurs membres de la famille ADAM, choisis comme candidats selon leur implication dans les pathologies rétiniennes et leur rôle sur la régulation de l'activité des récepteurs TAM.

# RESULTATS

## I. Le clivage de MerTK

### 1. Introduction

Dans la rétine, l'EPR réalise la phagocytose rythmique des SEP, qui ont accumulé du stress oxydatif suite à l'exposition aux photons. La machinerie phagocytaire utilisée par les cellules d'EPR est similaire à celle utilisée par les macrophages pour la clairance des cellules apoptotiques. Les PtdSer présentes à la surface des cellules apoptotiques et des SEP sont reconnues par MFG-E8, le ligand soluble des intégrines  $\alpha v \beta 3$ , chez les macrophages et  $\alpha v \beta 5$  chez l'EPR. Ce couple ligand-récepteur permet de lier les particules à phagocyter et d'activer au moment du pic de la phagocytose rétinienne le récepteur MerTK impliqué dans l'étape d'internalisation. En retour, MerTK réalise une boucle de rétrocontrôle afin de limiter la quantité de SEP liés à la surface de l'EPR par l'intégrine  $\alpha v \beta 5$ . Récemment, le clivage de l'ectodomaine de MerTK a été découvert chez les macrophages, qui conduit à la libération dans le milieu extracellulaire d'une forme soluble du récepteur, sMerTK.

Avant mon arrivée au laboratoire des études préliminaires avaient permis de montrer les premiers résultats de cet article, correspondants au clivage *in vitro* de MerTK qui implique une diminution de sa disponibilité à la surface des cellules. L'étude de l'expression du gène *MerTK* au cours du rythme circadien a été effectuée par un collègue. J'ai pu mettre en évidence le rythme circadien du clivage de MerTK *in vivo*, et montrer *in vitro* l'implication des ligands dans ce clivage et la phagocytose.

### 2. Résultats

Au cours de cette étude nous avons montré l'existence d'un clivage de MerTK *in vitro*, qui peut être modulé par les ligands solubles, et *in vivo* dans la rétine de souris.

*In vivo*, la quantité de sMerTK suit un rythme circadien avec une augmentation juste avant l'arrivée de la lumière et au moment du pic de phagocytose et une diminution avant ce pic. Le profil d'expression de son gène est un peu complémentaire de celui du clivage de MerTK. En effet, la synthèse de MerTK est minimale au moment du pic de phagocytose correspondant au moment où le clivage de MerTK est augmenté. Et l'expression maximale de MerTK a lieu à 11 heures, soit juste après le pic de phagocytose et l'utilisation des récepteurs.

*In vitro*, les ligands MFG-E8, Gas6 et Protéine S sont capables de moduler le clivage de MerTK et la phagocytose. MFG-E8, augmente nettement le clivage de MerTK et les deux étapes de la phagocytose, la liaison et l'internalisation. Les effets de Gas6 et Protéine S, les ligands de MerTK, sont moins prononcés et opposés sur ces deux processus. Gas6 augmente le clivage de MerTK et diminue l'internalisation de manière dose-dépendante, tandis que Protéine S diminue le clivage de MerTK et augmente l'internalisation. Dans des conditions identiques, les macrophages réagissent différemment puisque leur phagocytose est stimulée similairement par les trois ligands sans effet de dose. Comme pour les macrophages, la présence de l'ectodomaine de MerTK dans le milieu de culture inhibe l'effet des ligands sur la capacité phagocytaire des cellules RPE-J, suggérant que dans la rétine sMerTK est aussi capable de lier ses ligands afin de bloquer leurs fonctions. Lorsque les cellules sont incubées avec un inhibiteur de protéases non spécifique, TAPI-0, le clivage de MerTK diminue et la liaison des SEP à ces cellules est augmentée.

Ces résultats sont présentés dans l'article ci-après « Cleavage of Mer Tyrosine Kinase (MerTK) from the Cell Surface Contributes to the Regulation of Retinal Phagocytosis » par A-L Law\*, C Parinot\* *et al*, publié dans le *Journal of Biological Chemistry* du 20 février 2015 (\* co-premiers auteurs).

# Cleavage of Mer Tyrosine Kinase (MerTK) from the Cell Surface Contributes to the Regulation of Retinal Phagocytosis\*

Received for publication, December 1, 2014. Published, JBC Papers in Press, December 23, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.628297

Ah-Lai Law<sup>‡§¶1</sup>, Célia Parinot<sup>‡§¶1</sup>, Jonathan Chatagnon<sup>‡§¶1</sup>, Basile Gravez<sup>‡§¶1</sup>, José-Alain Sahel<sup>‡§¶||</sup>, Shomi S. Bhattacharya<sup>‡§¶\*\*\*</sup>, and Emeline F. Nandrot<sup>‡§¶12</sup>

From the <sup>‡</sup>INSERM, U968, <sup>§</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S968, Institut de la Vision, <sup>¶</sup>CNRS, UMR\_7210, 17 Rue Moreau, Paris, F-75012, France, the <sup>||</sup>Centre Hospitalier National d'Ophtalmologie des Quinze-Vingts, INSERM-Direction de l'Hospitalisation et de l'Offre de Soins Centre d'Investigation Clinique 1423, Paris, F-75012, France, the <sup>\*\*\*</sup>Institute of Ophthalmology, University College London, WC1E 6BT London, United Kingdom, and the <sup>\*\*</sup>Andalusian Center of Molecular Biology and Regenerative Medicine (CABIMER), 41092 Sevilla, Spain

**Background:** The MerTK receptor is necessary for retinal phagocytosis and its daily rhythm.

**Results:** MerTK is cleaved from the apical cell surface *in vitro* and *in vivo*, reducing the phagocytic capacity of RPE cells.

**Conclusion:** MerTK cleavage might help control the duration of the daily phagocytic peak.

**Significance:** Our data show that extracellular cleavage of MerTK partly regulates retinal phagocytosis.

Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and spent photoreceptor outer segments (POS) by retinal pigment epithelial (RPE) cells requires several proteins, including MerTK receptors and associated Gas6 and protein S ligands. In the retina, POS phagocytosis is rhythmic, and MerTK is activated promptly after light onset via the  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin receptor and its ligand MFG-E8, thus generating a phagocytic peak. The phagocytic burst is limited in time, suggesting a down-regulation mechanism that limits its duration. Our previous data showed that MerTK helps control POS binding of integrin receptors at the RPE cell surface as a negative feedback loop. Our present results show that a soluble form of MerTK (sMerTK) is released in the conditioned media of RPE-J cells during phagocytosis and in the interphotoreceptor matrix of the mouse retina during the morning phagocytic peak. In contrast to macrophages, the two cognate MerTK ligands have an opposite effect on phagocytosis and sMerTK release, whereas the integrin ligand MFG-E8 markedly increases both phagocytosis and sMerTK levels. sMerTK acts as a decoy receptor blocking the effect of both MerTK ligands. Interestingly, stimulation of sMerTK release decreases POS binding. Conversely, blocking MerTK cleavage increased mostly POS binding by RPE cells. Therefore, our data suggest that MerTK cleavage contributes to the acute regulation of RPE phagocytosis by limiting POS binding to the cell surface.

Phagocytosis is a general process that permits the elimination of apoptotic cells and foreign bodies by professional phagocytes such as macrophages (1). Other efficient phagocytes exist in the body, including retinal pigment epithelial (RPE)<sup>3</sup> cells

that lie adjacent to photoreceptors at the back of the eye (2). Constant light illumination of photosensitive outer segment of photoreceptor cells for vision generates oxidative damage. In parallel, photoreceptors continuously renew their outer segments and shed their aged tips (POS), which are then phagocytosed daily by neighboring RPE cells (3, 4). This circadian-regulated process is indispensable for vision (5, 6), and the synchronized internalization of POS is dependent on the activation of cell surface receptors and associated downstream signaling molecules.

RPE phagocytosis uses many of the molecular components employed by macrophages to clear apoptotic cells. Specific recognition of cells to be eliminated is triggered by the exposure of phosphatidylserines (PS) on the external membrane leaflet (7–9). Normal RPE cells specifically bind and internalize PS-containing liposomes (10). Milk fat globule-EGF factor 8 protein (MFG-E8), a soluble bridging molecule secreted by macrophages and dendritic cells, links the PS-containing apoptotic cells to  $\alpha\text{v}\beta 3$  and  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin receptors via its RGD motif (11). MFG-E8 is secreted by RPE cells (12) and mediates POS binding to  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin receptors that are uniquely expressed on the apical surface of RPE cells (13). The  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin-MFG-E8 couple is essential for the daily burst of phagocytosis observed 1–2 h after light onset as shown by knock-out animal models (12, 14).

Another series of soluble ligands able to bind PS for apoptotic cell elimination are Gas6 and protein S (15, 16), vitamin K-dependent proteins that are common ligands for the TAM (Tyro3, Axl, and MerTK) family of tyrosine kinase receptors (17). Both ligands can independently activate MerTK in macrophages and RPE cells (18, 19) and stimulate POS phagocytosis by RPE cells *in vitro* (20, 21). Although they circulate in the bloodstream, they are also synthesized in the retina and

\* This work was supported by Fondation Voir et Entendre and Fondation Bettencourt Schueller, young investigator grants (to E. F. N.), Agence Nationale de la Recherche, Jeunes Chercheurs/Jeunes Chercheuses Grant ANR-12-JSV1-0003 (to E. F. N.), and Chaire d'Excellence (to S. S. B.), CNRS.

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<sup>2</sup> To whom correspondence should be addressed: Institut de la Vision, 17 Rue Moreau, Paris, F-75012, France. Tel.: 33-1-5346-2541; Fax: 33-1-5346-2602; E-mail: emeline.nandrot@inserm.fr.

<sup>3</sup> The abbreviations used are: RPE, retinal pigment epithelium; IRBP, interphotoreceptor retinoid binding protein; PEDF, pigment epithelium-derived

factor; IPM, interphotoreceptor matrix; POS, photoreceptor outer segment; ANOVA, analysis of variance; CM, conditioned medium; sMerTK, soluble MerTK; CHX, cycloheximide; qPCR, quantitative PCR; PS, phosphatidylserine; rMerTK, recombinant mouse MerTK; HBSS, Hanks' buffered saline solution.



secreted in the interphotoreceptor space (19). Single and double knock-out mice showed that these two ligands can compensate for each other to some extent but are both required for POS phagocytosis (22). Indeed, double knock-out mice recapitulated the fast retinal degeneration phenotype observed in MerTK-deficient animals (23–25). MerTK-deficient animals carry more widespread defects, as general phagocytosis of apoptotic cells is also impaired (26). MerTK has been shown to be the indispensable receptor for POS internalization (4, 27, 28). Importantly, mutations in *MERTK* have been shown to cause different types of retinal dystrophies in humans (29–31) and are associated with more widespread diseases such as cancer (32), lupus-like autoimmunity (33, 34), and atherosclerosis (35).

Phagocytosis is a powerful process strictly regulated at several cellular levels. In addition to the sequential receptor-ligand activation steps undertaken by the  $\alpha v \beta 5$  integrin receptor, MerTK also controls the number of particles to be engulfed (36, 37), thus acting as a negative feedback regulator. However, in contrast to macrophages, RPE cell phagocytosis follows a diurnal cyclic rhythm despite the permanent contact between POS and RPE cells (5), suggesting that a more sophisticated regulatory mechanism exists in RPE cells.

There are numerous ways by which ligand/receptor function can be regulated, such as the control of cell surface receptor numbers, their ligand affinities, or the production of a soluble form of the receptor by proteolytic cleavage of the extracellular domain (38). Soluble receptors can have more than one occupation (39); they may function as binding proteins to stabilize ligands in the extracellular matrix and enhance interaction with the membrane-bound receptors, can down-regulate ligand-related activation and associated downstream signaling, or might act as decoy receptors by competing with full-length membrane receptors for ligand binding.

Recently, both Axl and MerTK have been shown to be cleaved and released as soluble proteins by fibroblasts and macrophages, respectively (40, 41). The soluble form of MerTK (sMerTK) was found to function as a decoy receptor for Gas6 and inhibit activation of full-length membrane-bound receptors (41). In this study, we show that sMerTK is released by RPE cells *in vitro*, and MerTK cleavage is potentiated by MFG-E8. In addition, sMerTK contributes to the down-regulation of POS binding and subsequent internalization by acting as a decoy receptor as well as by down-regulating directly the phagocytic capacity of RPE cells. Furthermore, sMerTK release is rhythmic *in vivo* and thus may help limit the phagocytic peak duration.

### EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents and Antibodies**—Reagents were from Invitrogen, unless otherwise stated. Recombinant proteins and antibodies against mouse MerTK, mouse MFG-E8, and mouse Gas6 were from R & D Systems, and recombinant protein S was from MP Biomedicals.

Other antibodies used against various proteins were as follows: PEDF (Abcam); mouse CD51 ( $\alpha v$  integrin) and mouse Tyro3 (BD Transduction Laboratories); rabbit  $\beta 5$  integrin H-96, MerTK E-20, and IRBP C-18 (Santa Cruz Biotechnology); rabbit tubulin (Sigma); rabbit ZO-1 (Invitrogen); and rabbit phospho-MerTK (FabGennix Inc. International).

**Cell Culture**—J774 macrophage cells were cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> in DMEM containing 10% FCS, supplemented with 1% nonessential amino acids and 1% sodium pyruvate. The rat RPE-J cell line (ATCC) was maintained at 32 °C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM with 4% CELlect Gold FCS (ICN), supplemented with 10 mM HEPES and 1% nonessential amino acids. For experiments, J774 cells were used 3 days after splitting. RPE cells were plated on Alcian blue-coated 24- or 96-well plates and allowed to polarize for 6 days before use.

**Animals**—Wild-type mice (129T2/SvEmsJ) were housed under cyclic 12-h light/12-h dark conditions (light onset at 8:00 h) and fed *ad libitum*. Animals were handled according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. For experiments, mice were killed by CO<sub>2</sub> asphyxiation at different times during the day. The 11 time points analyzed were as follows: 6:00, 7:00, 8:00 (light onset), 9:00, 10:00 (phagocytosis peak), 11:00, 12:00, 16:00, 20:00 (light offset), 22:00, and 24:00. Eyeballs were carefully enucleated and rinsed in HBSS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. The lens and vitreous humor were dissected out. Retinas were delicately separated from the eyecups containing the RPE/choroid layers and quickly frozen in independent tubes in liquid nitrogen. For each animal, one eye was used for RNA extraction and gene expression testing and the second eye for protein expression level assessment (see below).

**POS Isolation**—POS were isolated according to established protocols (42) from porcine eyes fresh from the slaughterhouse. Briefly, in the dark under dim red light, eyeballs were separated into anterior and posterior halves, and retinæ were collected in homogenization buffer (20% sucrose, 20 mM Tris acetate, pH 7.2, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 5 mM taurine). Following collection, the retina suspension was shaken to disrupt the different cell layers and filtered three times through gauze to remove large tissue fragments. The resulting crude retina suspensions were layered onto continuous 25–60% sucrose gradients (in Tris acetate, pH 7.2, 10 mM glucose, 5 mM taurine) and centrifuged at 25,000 rpm for 50 min at 4 °C (Beckman SW32-Ti swing rotor). The resulting orange bands were collected and diluted in 4–5 volumes of buffer containing 20 mM Tris acetate, pH 7.2, 5 mM taurine, followed by centrifugation at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C (Beckman JA25.50 rotor). Pellets were washed in buffer containing 10% sucrose, 20 mM Tris acetate, pH 7.2, 5 mM taurine. The suspensions were spun at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C before resuspending in 10% sucrose, 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, and 5 mM taurine and centrifugation at 5,000 rpm for 10 min at 4 °C. Isolated POS were resuspended, counted, aliquoted, and frozen in DMEM containing 2.5% sucrose.

For labeling, POS were resuspended in 10% sucrose, 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, and 5 mM taurine and incubated with 1 mg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC) (Molecular Probes) for 1.5 h at room temperature by rotating. Labeled POS were then washed and frozen as described above.

**POS Phagocytosis**—Cells were challenged with ~10 POS per RPE cell resuspended in the culture medium without FCS for durations ranging from 1 h to overnight depending on the experiment. In some assays, recombinant integrin or MerTK



ligand proteins at various concentrations ranging from 1 to 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and recombinant MerTK (200  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) were incubated with FITC-POS in serum-free medium for 1 h at room temperature on a rotator to allow binding. Coated FITC-POS were washed twice in equal volumes of serum-free medium and resuspended at equal particle concentration before challenging the cells. For POS phagocytosis quantification assays, cells were washed three times with PBS-CM (0.2  $\text{mM}$   $\text{Ca}^{2+}$  and 1  $\text{mM}$   $\text{Mg}^{2+}$ ) at the end of the incubation times. To measure internalized POS, some wells were incubated with trypan blue for 10 min to quench fluorescence of surface-bound FITC-labeled POS as described previously (13). Nontreated wells allow the measurement of total phagocytosis, corresponding to the fluorescence of both bound and internalized POS. All cells were then washed twice with PBS-CM and fixed with ice-cold methanol. Nuclei were counterstained using DAPI. FITC-POS and DAPI-labeled nuclei were quantified by fluorescence plate reading (Infinite M1000, Magellan 6 software, Tecan). Binding ratios were calculated by subtracting results obtained in internalization (trypan blue-treated) from total phagocytosis (untreated) wells. Corresponding S.D. were calculated using Equation 1,

$$\text{S.D.}_{\text{binding}} = \sqrt{((\text{S.D.}_{\text{total}})^2/n_{\text{total}}) + ((\text{S.D.}_{\text{intern}})^2/n_{\text{intern}})} \quad (\text{Eq. 1})$$

**Retrieval of Extracellular Soluble Proteins from RPE-J Cells and Mouse Eyes**—Cells were incubated in serum-free medium or POS for various lengths of time to obtain MerTK release in the culture medium. Soluble proteins present in the conditioned media (CM) of cultured cells were collected and concentrated  $\sim 6$ -fold using Amicon ultracentrifugal filter units (Millipore) with a cutoff limit of 30 kDa. When CM were used to resuspend POS, the cutoff limit of the columns was at 100 kDa, to remove growth factors and ligands secreted by RPE cells from the CM, and the concentration factor was  $\sim 50$ -fold. Soluble proteins from the interphotoreceptor matrix of mouse eyes were washed from each separated cup (RPE/choroid) and corresponding retina in HBSS without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  for 20 min on a shaker at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Samples were centrifuged at  $14,000 \times g$  for 5 min at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Supernatants were collected and ultracentrifuged at  $110,000 \times g$  for 30 min at 4  $^{\circ}\text{C}$  for further clean-up (Sorvall M120 S.E. Discovery, S120-AT2 rotor).

**Sample Lysis and Immunoblotting**—Cultured cells were solubilized in 50  $\text{mM}$  HEPES, 150  $\text{mM}$  NaCl, 10% glycerol, 1.5  $\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , and 1% Triton X-100, pH 7.4, buffer with 1  $\text{mM}$  PMSF and 1% each of protease and phosphatase inhibitor mixtures (Sigma). Tissues were solubilized in 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50  $\text{mM}$  HEPES, 150  $\text{mM}$  NaCl, 10% glycerol, 1.5  $\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ , 1  $\text{mM}$  EGTA, with 1  $\text{mM}$  PMSF, and 1% each of protease and phosphatase inhibitor mixtures. Whole cell lysates representing  $\sim 8\%$  of 1 well of a 24-well plate and 7.5% of one eye cup/retina were separated on SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membrane (Whatman). For soluble extracellular proteins,  $\sim 30\%$  of concentrated conditioned media and 25% of interphotoreceptor matrix proteins mixed 1:1 between separated cups and matched retina samples were used. Immunoblots were probed with primary antibodies overnight and secondary antibodies

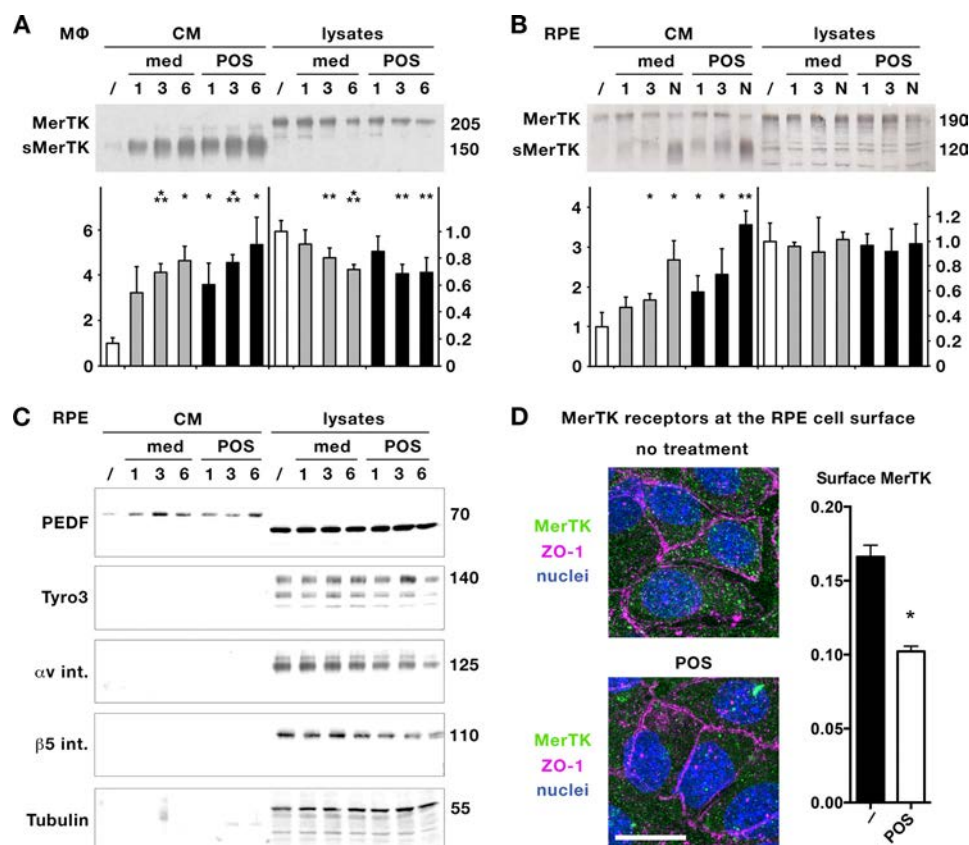
for 2 h, washed four times in  $1 \times$  TBS, 0.05–1% Tween 20 at room temperature followed by chemiluminescence detection (PerkinElmer Life Sciences). Chemiluminescence films (Amersham Biosciences) were scanned, and signals were quantified using ImageJ 1.45s (National Institutes of Health).

**Immunofluorescence Microscopy**—After incubation with unlabeled POS, cells were washed twice with HBSS-CM (with  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) or PBS-CM for surface or intracellular labeling, respectively. Briefly, for live labeling of cell surface proteins, antibodies were diluted in HBSS-CM, and cells were incubated for 45 min on ice. Cells were washed twice with PBS-CM before TCA fixation on ice for 15 min. Fixed cells were re-hydrated with PBS-CM and treated with 30  $\text{mM}$  glycine in PBS-CM, and nonspecific sites were blocked with 1% BSA in PBS-CM. Primary antibody incubation for intracellular labeling were performed overnight at 4  $^{\circ}\text{C}$  or for 2 h at room temperature. Cells were washed three times with 1% BSA in PBS-CM. AlexaFluor secondary antibodies (Molecular Probes) were incubated on cells for 2 h at room temperature, followed by washing with PBS-CM, labeling cell nuclei with DAPI, and mounting onto glass slides with Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc.).

All fluorescent images were acquired with an upright Olympus FV1000 confocal microscope using the Fluoview 2.1c software. Similar stacks of images were compiled and further treated equally for signal output levels using Adobe Photoshop CS6. Relative surface fluorescence levels were quantified with ImageJ 1.45s.

**Quantification of MerTK Gene Expression**—Total RNAs were extracted from separated retina and RPE/choroid according to the manufacturer's protocol using two DNase steps (Illustra RNAspin Mini, GE Healthcare). RNAs were verified on 1% agarose gels and yields assessed using a spectrophotometer. 500 ng of RNAs were converted to cDNAs in a 50- $\mu\text{l}$  volume following the instructions provided for 1 h at 42  $^{\circ}\text{C}$  (Reverse Transcription System, Promega). qPCRs using the SYBR Green PCR Master Mix were processed as follows on a 7500 Fast Real Time PCR System apparatus (Applied Biosystems): 50  $^{\circ}\text{C}$  for 2 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  for 10 min, followed by 40 cycles of 95  $^{\circ}\text{C}$  for 15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  for 1 min. The ribosomal protein Rho0 (*Rplp0*) gene was used as internal control. Oligonucleotides with the following sequences were designed to obtain 150-bp amplicons: *Rplp0*, forward 5'-CCTGAAGTGCTCGACATCAC and reverse 5'-TGC-CAGGACGCGCTTGTAC; *MerTK*, forward 5'-CGTCTGTC-CTAACCGTACCT and reverse 5'-GTACTGTTGAGGAT-ATGGACT. Relative amounts of MerTK were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method evaluating differences in fold expression with the internal control and amounts at 8 a.m. (8:00, light onset) being set as 1.

**Studying the Effects of MerTK Ectodomain Cleavage**—To investigate the possible role of shed MerTK receptors on POS tethering and internalization, CM were collected after the overnight incubation of RPE-J or J774 cells on 10-cm dishes and concentrated on filter columns with a cutoff at 100 kDa to eliminate ligands and growth factors. Each CM from one dish was used for 20 wells of a 96-well plate. FITC-POS were resuspended either in medium or in each CM, and naive cells were challenged for 3 h and their phagocytic capabilities quantified.



**FIGURE 1. Cleavage of MerTK is potentiated by POS and decreases amounts of available surface receptors.** A and B, representative immunoblots and corresponding quantifications showing that sMerTK is cleaved from the cell surface with time and is present in increasing amounts in the CM from J774 (A) and RPE-J (B) cells incubated with either medium (med) or POS for 1, 3, and 6 h or overnight (N) at a smaller size than the full-length MerTK (MerTK) detected in cell lysates. Concomitant decrease of total lysate amounts is only detectable for J774 cells. Sizes are in kDa. Relative levels with the levels in wells subjected to medium change and immediate retrieval are set as 1, mean  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ , Student's  $t$  test, \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . C, representative control RPE-J immunoblots for various proteins as indicated. PEDF serves as positive control, and Tyro3,  $\alpha_v$ , and  $\beta_5$  integrin as negative controls for CM release detection, and tubulin corresponds to a lysate loading control. D, surface amounts of full-length MerTK decrease after 3 h of POS incubation as shown by immunofluorescence labeling (left panels, green labeling) and corresponding quantification of relative MerTK levels (right panel) at the surface of RPE-J cells when compared with nontreated cells (/) as indicated. ZO-1 (purple) is used as cell junction marker. Nuclei (blue) are marked with DAPI. Scale bar, 20  $\mu$ m. Means  $\pm$  S.D.,  $n = 2$  independent experiments, Student's  $t$  test, \*,  $p = 0.009$ .

Alternatively, recombinant mouse MerTK, constituted from the extracellular domain fused with a human Fc domain, was mixed with the POS resuspension in the presence or absence of phagocytosis ligands before POS challenge.

To study the effects of MerTK cleavage on cells' further phagocytic activity, RPE-J cells were plated on 48-well plates, and cells were either pre-stimulated with unlabeled POS or medium for 3 h to initiate receptor cleavage in the presence or absence of 100  $\mu$ g/ml cycloheximide to stop protein neosynthesis. Control wells were stimulated with medium only or left untouched. Cells were then stimulated with labeled POS with or without cycloheximide for phagocytosis assays.

**Blockade of Protease Function**—To test the effect of blocking protease function on MerTK cleavage and phagocytosis, cells were washed with DMEM and were pretreated for 3 h with medium or POS, with the addition of the nonspecific inhibitor TAPI-0 (Peptides International) at 200  $\mu$ M (41) or DMSO as control. In the first series of experiments, CM were collected and concentrated as described above for immunoblotting. In the second series of experiments, phagocytosis assays were performed, again with TAPI-0 or DMSO.

**Statistical Analysis**—All experiments were repeated between 3 and 8 times. Obvious outliers were removed from the calcu-

lations on the basis of their highest difference to the calculated mean when including all samples. Significance of results was assessed using either the Student's  $t$  test in one-to-one comparisons or nonparametric one-way ANOVA with a Tukey post test when comparing multiple samples. In all cases, significance levels are depicted as follows: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; and \*\*\*,  $p < 0.001$ .

## RESULTS

**MerTK Is Cleaved by RPE-J Cells, a Phenomenon Potentiated by the Presence of POS**—Fully glycosylated, membrane-bound MerTK was detected at 205 kDa in mouse J774 cells (Fig. 1A). Consistent with a previous report using J774 macrophages, MerTK extracellular domain was cleaved and released in the CM from J774 macrophages as a soluble protein of  $\sim$ 150 kDa (41). sMerTK release increased with time, and a concomitant significant decrease of full-length MerTK levels was observed in corresponding lysates. In RPE-J cells, full-length MerTK is modestly smaller and migrates around 190 kDa as observed previously (28). Similarly to J774 macrophages, a soluble form of the receptor was detected in RPE-J cells with a size around 120 kDa (Fig. 1B). sMerTK cleavage increased with time and was slightly more pronounced when cells were incubated with

POS compared with medium alone. However, very little variation in total MerTK levels was detected in cells lysates. Interestingly, there was much more of a production of sMerTK by macrophages than by RPE cells.

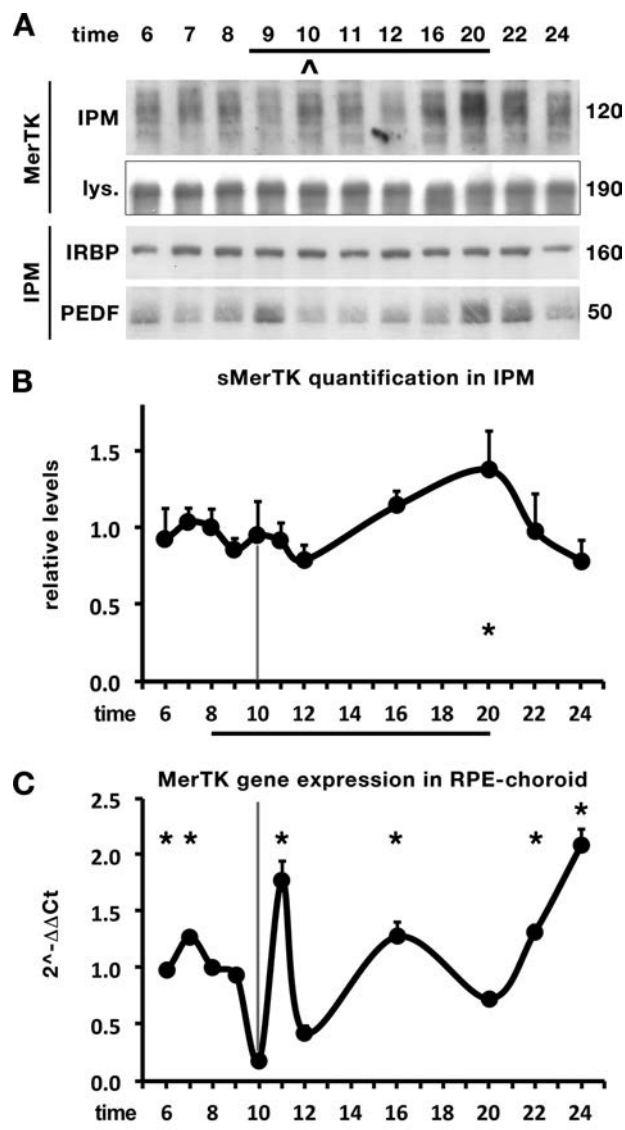
Secretion of the PEDF growth factor by RPE cells was used as a positive control of protein detection in CM samples and tubulin as a control for equal protein loading of lysate samples (Fig. 1C). The cleavage process was specific to the MerTK receptor, as neither Tyro3 (belonging to the TAM family) nor  $\alpha v$  nor  $\beta 5$  integrin subunits (jointly forming the  $\alpha v \beta 5$  binding receptor) were found in the CM of RPE-J cells.

We also evaluated the amounts of full-length MerTK receptors present at the surface of RPE-J cells by immunofluorescence labeling of surface MerTK (Fig. 1D). Decrease in surface MerTK was concomitant to the release of sMerTK in the CM. After 3 h of incubation, the amount of intact receptors detected at the cell surface was decreased in POS-stimulated cells, when compared with nontreated cells.

**sMerTK Release into the Interphotoreceptor Space in Vivo Varies over Time**—Given that MerTK activation by phosphorylation is synchronized with the phagocytic peak *in vivo* (14), it would be interesting to see whether sMerTK release into the interphotoreceptor matrix (IPM) changes over the light/dark cycle. We sacrificed animals at 11 different time points during the day and isolated soluble proteins from the interphotoreceptor space. We detected different amounts of sMerTK in the IPM of wild-type mice depending on the time of day (Fig. 2A). We used IRBP, a protein constitutively present in the IPM, and PEDF, a growth factor secreted by RPE cells on their apical side *in vivo*, as positive controls to validate our IPM protein retrieval technique. Quantifications of replicate experiments show that sMerTK levels seem to follow a bi-modal profile of release, with levels of sMerTK augmenting just before light onset and offset (8 a.m. and 8 p.m. in our facility, respectively). Maximum MerTK cleavage was observed at the light offset (8 p.m., 20:00). Interestingly, levels of sMerTK decrease at 9 a.m., just before and increase at the time of the phagocytic peak (2 h after light onset, 10 a.m. in our facility) (Fig. 2B). After peak phagocytosis time, levels of sMerTK slowly rise after 12 p.m. until 8 p.m. Levels of IRBP do not seem to vary along the light/dark cycle, although levels of secreted PEDF appear to increase slightly after or at each light switch (9 a.m. and 8–9 p.m.).

We then investigated whether MerTK gene expression was modified to replenish cleaved MerTK receptors. With the second eye from each animal, we quantified *MerTK* gene expression levels by qPCR in the RPE/choroid fraction. Interestingly, the gene transcription pattern appears to be somewhat complementary to the sMerTK cleavage profile (Fig. 2C). Indeed, MerTK synthesis reached its minimum at the time of both peak phagocytosis and sMerTK detection in the IPM. Moreover, maximal gene expression occurred at 11 a.m. right after the phagocytic peak.

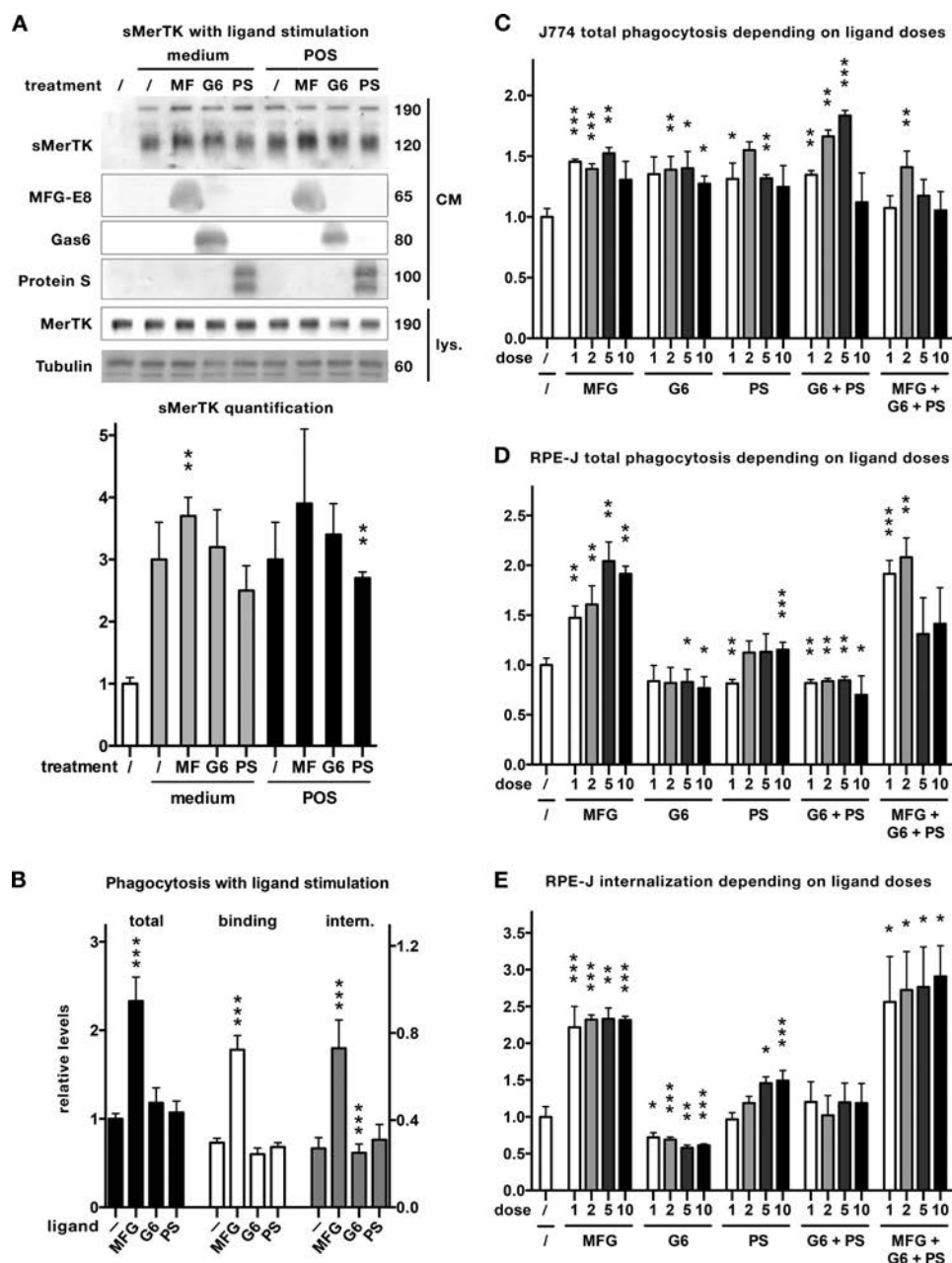
**Different Roles of the Phagocytic Ligands in sMerTK Release**—*In vivo*, phagocytosis is rhythmically activated by the receptor-ligand couple  $\alpha v \beta 5$  integrin-MFG-E8 (12, 14). In addition, MerTK ligands Gas6 and protein S are also expressed in the retina, and both are required for photoreceptor survival (19, 22). Thus, we set out to examine the possible implications of



**FIGURE 2. MerTK is cleaved from the RPE apical surface *in vivo* following a circadian rhythm.** A, levels of sMerTK in the IPM vary with time of day as observed on immunoblots compared with RPE/choroid lysates (*lys.*) as indicated. IRBP, stably present in the IPM, and PEDF, secreted by the RPE, are shown as controls for IPM protein retrieval. Bar shows daytime and  $\Delta$  peak phagocytosis time. B, corresponding quantification of relative sMerTK levels present in the IPM at different times of day expressed as mean  $\pm$  S.D. in arbitrary units,  $n = 4-8$ ; \*,  $p < 0.05$ . The 8 a.m. time point is set as 1 and is used as comparison for statistics. A decrease in sMerTK release is detected just before and after peak phagocytosis time (10, gray bar), as well as after light offset (20) when sMerTK cleavage reaches its highest levels. C, quantification of *MerTK* gene expression in RPE/choroid tissues assessed by qPCR and expressed as mean  $2^{-\Delta\Delta Ct} \pm$  S.D.,  $n = 3-6$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . We used the ribosomal protein Rho0 *RPLP0* gene as internal control. *MerTK* transcription increases greatly just after peak phagocytosis (10, gray bar). B and C, x axis represents time of day on a 24-h scale, and the black horizontal bar represents light time (8:00–20:00). For both graphs, the reference set as 1 is 8 a.m. (8:00, light onset), and significance was assessed using one-way ANOVA comparisons versus phagocytic peak time (10). Interestingly, sMerTK and *MerTK* expression show different patterns.

these different ligands on sMerTK cleavage and their role in POS phagocytosis. RPE cells were stimulated with POS in the presence or absence of 2  $\mu$ g/ml Gas6, protein S, or MFG-E8 (Fig. 3A) (20, 21). The integrin ligand MFG-E8 had more impact on sMerTK release than MerTK's own ligands. Gas6 seems to slightly increase sMerTK release, although protein S signifi-





**FIGURE 3. Integrin ligand MFG-E8 stimulates MerTK cleavage and phagocytosis, although MerTK ligands Gas6 and protein S have opposite and more subtle roles.** *A*, representative immunoblots and corresponding quantification showing that amounts of sMerTK are increased when cells are incubated with POS and the integrin ligand MFG-E8 (MF) for 3 or 6 h as indicated, although Gas6 (G6) and protein S (PS) have a much more limited effect. Ligands dose, 2  $\mu$ g/ml. Mean  $\pm$  S.D.,  $n = 3-4$ . *B*, in the same conditions as in *A*, relative levels of total POS phagocytosis, POS binding, and internalization (*intern.*) were similar to the sMerTK production profile, as indicated. Mean  $\pm$  S.D. with no ligand control total phagocytosis (I) set as 1,  $n = 4$ . The left x axis scale corresponds to both total POS phagocytosis and POS binding, and the right x axis scale to POS internalization. *A* and *B*, significance was assessed using one-way ANOVA comparisons versus either nontreated (*A*) or POS challenged cells (*B*); \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . *C*, all ligands similarly stimulated total phagocytic activity of J774 macrophages when various doses of ligands ranging from 1 to 10  $\mu$ g/ml were used either alone or in combination during 3 h of phagocytic challenge. *D* and *E*, in the same conditions, MFG-E8 greatly stimulated POS total phagocytosis (*D*) as well as internal (*E*) phagocytosis in RPE-J cells (RPE). Gas6 seems to bear an inhibitory role on POS phagocytosis as depicted on this phagocytosis quantification of RPE-J cells when protein S appeared stimulatory. Gas6 effect was dominant on total phagocytosis when used in combination with protein S, although MFG-E8 effect was superior to both MerTK ligands when all three were tested. Effects were more marked for POS internalization (*E*) compared with total phagocytosis (*D*, total = binding + internalization). *C-E*, mean  $\pm$  S.D., POS without ligand (I) is set as 1,  $n = 3$  (*D* and *E*) to 5 (*C*). Significance was assessed using Student's *t* test using POS alone (I) as reference; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . ANOVA comparisons for dose-effect validation did not show any significant difference between the doses tested for each ligand series.

cantly reduces it, especially in the presence of POS. The 3-h phagocytosis assays using the same conditions showed a similar trend with MFG-E8 strongly augmenting total phagocytosis, corresponding to the sum of bound and internalized POS, whereas the impact of MerTK ligands, Gas6 and protein S, was

more restricted, with Gas6 limiting internalization, although protein S appeared to increase it slightly (Fig. 3*B*).

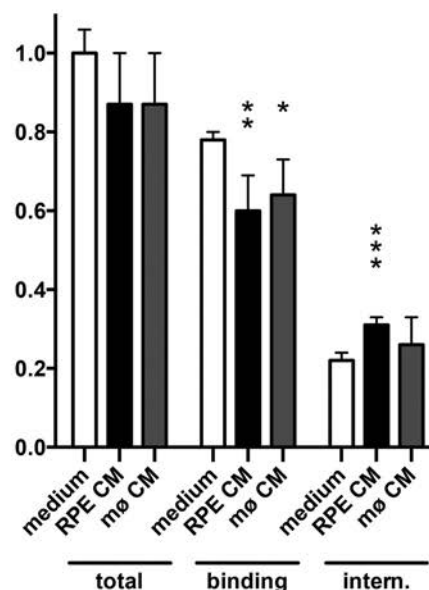
All three ligands are present in the IPM *in vivo* and may contribute to the timely daily activation of the RPE phagocytic machinery. Thus, to examine their role further, we carried out

similar assays using 1–10  $\mu\text{g/ml}$  ligand concentrations either alone or in combination to test whether we could see more marked differences. J774 macrophages responded with an equal increase in total POS phagocytosis in all conditions, regardless of the dose and combination of ligands tested compared with POS alone (on average  $\times 1.36 \pm 0.05$ ; Fig. 3C). In contrast, these ligands had distinctive effects on total POS phagocytosis by RPE-J cells. As showed in Fig. 3B, MFG-E8 ( $\times 1.7\text{--}1.8 \pm 0.2$ ) dramatically affected total POS phagocytosis compared with Gas6 ( $\times 0.8 \pm 0.1$ ) or protein S ( $\times 1.1 \pm 0.1$ ) (Fig. 3D). Increasing MFG-E8 concentrations improves RPE-J phagocytosis above 5  $\mu\text{g/ml}$ . Increasing Gas6 concentrations resulted in slightly decreased phagocytosis, although protein S doses had a small stimulatory effect above 2  $\mu\text{g/ml}$ . Stimulating RPE cells with POS in the presence of both Gas6 and protein S at increasing concentrations had similar effects on total phagocytosis as Gas6 alone. However, when all three ligands were combined, the phagocytic profile was similar to cells stimulated with MFG-E8 alone at 1–2  $\mu\text{g/ml}$ , although levels show a decrease at 5–10  $\mu\text{g/ml}$ .

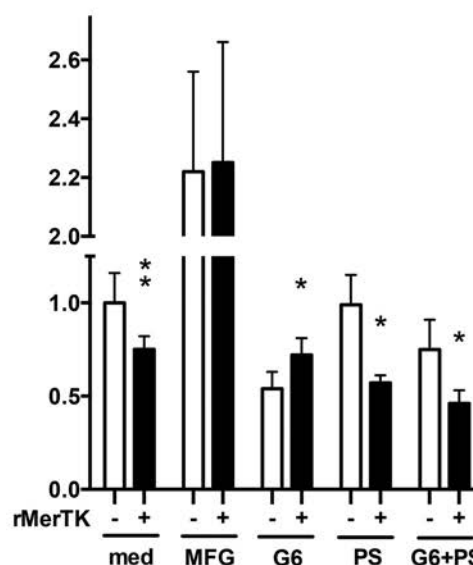
As phagocytosis proceeds in two sequential and distinct steps, binding and internalization (43), we repeated phagocytosis assays under the same conditions with the different ligands to test whether their doses and/or combinations affected binding and/or internalization during RPE phagocytosis. POS binding profiles were less modified by the addition of ligands compared with POS alone than total phagocytosis profiles (data not shown). MFG-E8 slightly stimulated binding ( $\times 1.3 \pm 0.2$ ); Gas6 and protein S inhibited binding alone or in combination ( $\times 0.8 \pm 0.2$ ,  $\times 0.8 \pm 0.1$ ,  $\times 0.8 \pm 0.1$ , respectively). Combination of all three ligands had no effect ( $\times 1.1 \pm 0.3$ ). Interestingly, the effect on POS internalization followed a similar trend as the one observed for total phagocytosis, with the effects being even more marked (compare Fig. 3, E with D). We confirmed a strong stimulatory effect with the addition of MFG-E8 to POS (on average  $\times 2.3 \pm 0.1$ ) compared with POS alone. The dose-dependent inhibitory effect of Gas6 was significant at all doses tested (on average  $\times 0.7 \pm 0.04$ ). In contrast, protein S had a slight dose-dependent stimulatory role ranging from  $\times 1$  to  $1.3 \pm 0.1$ . Combining both Gas6 and protein S at equal doses quenched the stimulatory effects observed with protein S alone, with levels comparable with POS alone ( $\times 1\text{--}1.2 \pm 0.3$ ). However, when added to MFG-E8, Gas6 and protein S appeared to enhance the stimulatory effect of MFG-E8 ( $\times 2.7 \pm 0.5$ ).

**sMerTK Acts as a Decoy Receptor**—It was previously shown that sMerTK prevents the phagocytosis of apoptotic cells by J774 macrophages by acting as a decoy receptor (41). To test the hypothesis that MerTK could act as a decoy receptor and abolish POS uptake by RPE cells, we incubated RPE-J cells overnight with POS to stimulate sMerTK cleavage. CM were collected and concentrated on columns with a cutoff size of 100 kDa to dispose of the ligands secreted by RPE cells and other small molecules such as growth factors that could interfere with the experiment. Concentrated CM containing sMerTK were used to resuspend and allowed to bind POS before challenging non-stimulated RPE-J cells for 3 h (Fig. 4A). CM from both RPE-J and J774 macrophages significantly block POS binding. CM from RPE-J seem to increase slightly POS internalization, sug-

## A Phagocytosis in the presence of sMerTK

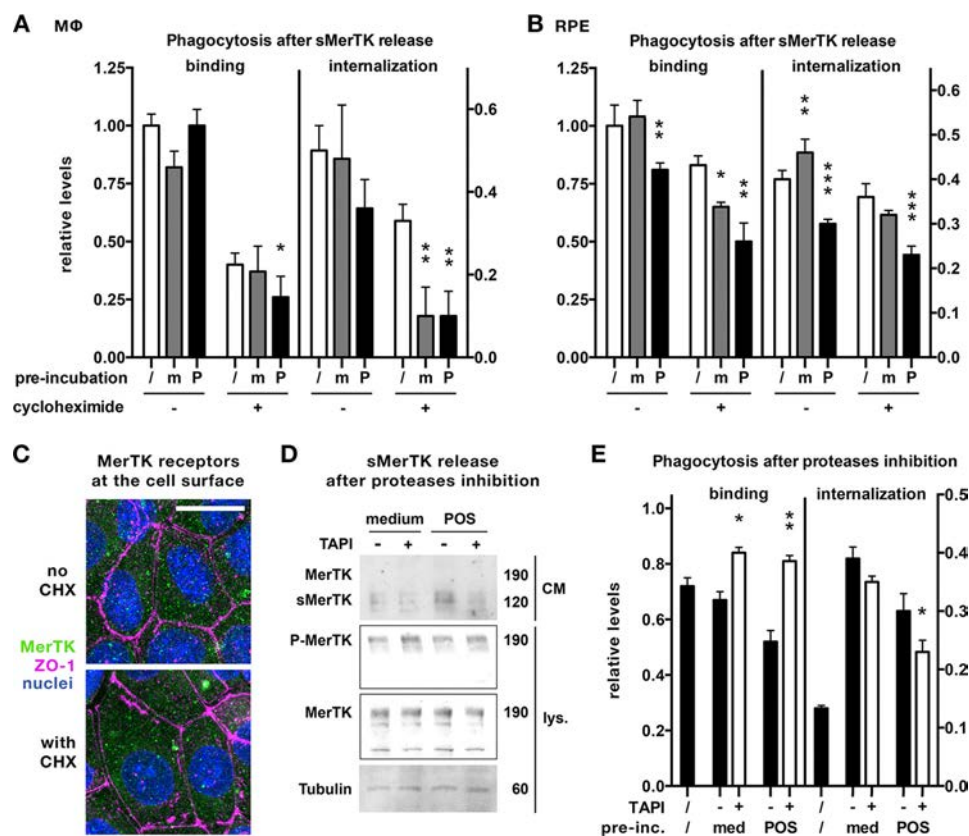


## B Phagocytosis in the presence of rMerTK



**FIGURE 4. sMerTK acts as a decoy receptor.** A, histogram representing the quantification of the relative total, binding, or internalization (*intern.*) phagocytic capacity of untreated RPE-J cells when challenged for 3 h with POS resuspended in regular medium (*medium*) or sMerTK-enriched CM concentrated from RPE-J (*RPE CM*) cells or J774 macrophages (*Mφ CM*) incubated overnight with serum-free medium as indicated. Presence of sMerTK significantly impacts all steps of phagocytosis by RPE cells. Mean  $\pm$  S.D.,  $n = 5$ , Student's *t* test; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . B, histogram representing the quantification of the relative total phagocytic capacity of untreated RPE-J cells when challenged for 3 h with POS resuspended in DMEM (*med*) with (+) or without (–) rMerTK, in the presence of various ligands (2  $\mu\text{g/ml}$ ) as indicated. rMerTK alone decreases phagocytosis, although it has no impact on the stimulatory effect of MFG-E8. rMerTK counteracts the inhibitory effect of Gas6 and the stimulatory effect of protein S. The lowest phagocytic levels were reached when rMerTK was present with both Gas6 and protein S. Mean  $\pm$  S.D.,  $n = 4$ , Student's *t* test; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

gesting a potential faster uptake of bound POS. We confirmed this result by using a recombinant mouse MerTK (rMerTK) that only contained the extracellular domain of MerTK (Fig. 4B). rMerTK also blocked POS phagocytosis. In the same con-



**FIGURE 5. Release of sMerTK down-regulates mostly the binding step of RPE phagocytosis.** A–C, stimulating cleavage of MerTK using a preincubation step with either medium (m, gray bars) or POS (P, black bars) with (+) or without (–) the addition of CHX to block protein neosynthesis inhibits relative POS internalization to a greater extent than relative POS binding for J774 macrophages (A, compare – and + bars) when compared with cells not subjected to a preincubation step (/, white bars). In contrast, the binding step is slightly more affected than the internalization step for RPE-J cells. B, RPE, compare gray/black bars to white bars in + panel) in the presence of CHX as indicated. A and B, mean  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ –5; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ . Statistical significance was assessed using a one-way nonparametric ANOVA test with a Tukey post-test using nontreated cells (/) as reference. C, immunofluorescence assay showing that, when protein replacement was inhibited using CHX (with CHX), less full-length MerTK receptors (green) were seen at the cell surface when compared with cells not treated with CHX (no CHX) as indicated. ZO-1 (purple) is used as a cell junction marker, and nuclei (blue) are marked with DAPI. Scale bar 20  $\mu$ m. D, cleavage of MerTK can be inhibited by using the protease inhibitor TAPI-0 as observed on immunoblots where sMerTK levels decrease in the CM of RPE-J cells with TAPI-0 (+) treatment compared with control DMSO (–) as indicated. Levels of active phosphorylated MerTK (P-MerTK) seem to increase concomitantly to the sMerTK decrease (compare – versus + lanes). Corresponding lysates show that full-length MerTK (MerTK) or control tubulin levels do not vary. Sizes are in kDa. E, quantification of relative phagocytosis levels in the same conditions as in D shows that inhibition of MerTK cleavage increases significantly POS binding, although POS internalization was less affected (compare white bars to black bars). Nontreated cells (/) are used as reference. Mean  $\pm$  S.D.,  $n = 3$ , \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ . Statistical significance was assessed using the Student's *t* test with nontreated cells (–) as reference for each bar pair.

ditions, we added each of the three phagocytic ligands previously tested. Although rMerTK had no effect on the MFG-E8-related stimulation of POS phagocytosis, it was able to counteract the effect of both MerTK ligands on phagocytosis. Indeed, the lowest levels of phagocytosis were reached when rMerTK was present concomitantly with Gas6 and protein S. Our data show that the presence of sMerTK has an inhibitory effect and blocks POS from being recognized and phagocytosed by RPE cells via functional full-length MerTK receptors.

**Cleavage of MerTK Modulates POS Binding by RPE Cells—**To further study the effect of MerTK receptor cleavage during POS phagocytosis, we performed a two-step experiment on J774 macrophages and RPE-J cells. First, cells were pre-stimulated with medium or unlabeled POS for 3 h to enable receptor cleavage as observed in Figs. 1 and 3 in the absence or presence of cycloheximide (CHX) to inhibit protein neosynthesis and thus avoid reconstitution of the full-length MerTK pool of receptors at the cell surface. Second, phagocytosis assays were performed with or without cycloheximide as before. Blocking

protein neosynthesis reduced both binding and internalization by non-pre-stimulated J774 cells by  $60 \pm 4$  and  $30 \pm 4\%$ , respectively (Fig. 5A, compare – and + bars). Reducing the amounts of full-length MerTK receptors at the J774 cell surface by preincubating the cells with medium or POS did not modify extensively their binding but significantly altered their internalization capacity by  $75 \pm 5\%$  in both conditions ( $p < 0.0005$ , compare gray/black bars to white bar). Internalization percentages were not modified when cells could resynthesize proteins (on average  $+ 32 \pm 2\%$  for medium or POS pretreated cells versus  $+ 33 \pm 2\%$  for non-pretreated cells, – cycloheximide). However, internalization percentage lowered to  $25 \pm 10\%$  when cells could not produce new proteins (+ cycloheximide).

In contrast, RPE-J cells responded differently, as binding was more affected when full-length membrane-bound MerTK receptors could not be replenished at the cell surface (Fig. 5B, compare – and + bars). In non-pretreated cells, cycloheximide only impacted RPE-J binding and internalization by  $17 \pm 5$  and  $8 \pm 2\%$ , respectively (Fig. 5B, compare white bars). Interestingly, cells pretreated with medium or POS to cleave MerTK



had their binding significantly impaired by  $37 \pm 4\%$  ( $p < 0.005$ ) and  $38 \pm 5\%$  ( $p < 0.001$ ), when internalization was diminished only by  $29 \pm 2$  and  $22 \pm 2\%$  ( $p < 0.001$ ), respectively (Fig. 5B, compare *gray* and *black bars*, respectively). Internalization percentages were not affected between the different conditions (with or without pretreatment and with or without protein neosynthesis inhibition), staying at an average of  $30 \pm 2\%$  in all samples, showing that differences were not due to impaired internalization in RPE-J cells. Levels of available full-length receptors at the cell surface were indeed decreased after 3 h of POS stimulation when treated with CHX compared with POS stimulation alone (Fig. 5C).

To confirm the effect of sMerTK on the respective phagocytosis steps in RPE-J cells, we used a pharmacological inhibitor of some metalloproteinases, TAPI-0, which has been shown to block sMerTK shedding in macrophages (41). As done in the previous experiment, RPE-J cells were treated with TAPI-0 with or without preincubation with medium or POS to stimulate sMerTK release. Western blot analysis revealed that cleavage of MerTK was diminished in the presence of TAPI-0 in comparison with controls after both medium and POS stimulation (Fig. 5D). Inhibition of metalloproteases, which decreased MerTK cleavage, concomitantly increased the number of MerTK receptors that were activated by phosphorylation, although no modification of the total amounts of MerTK in full cell lysates could be observed as already described in Fig. 1B. When phagocytosis assays were performed with the same TAPI-0 treatment conditions, the amount of POS bound by RPE cells was increased by  $26 \pm 2$  and  $57 \pm 3\%$  when preincubated with medium and POS, respectively (Fig. 5E, compare *white versus black bars*). However, in the same conditions POS internalization was affected to a lesser extent and diminished by  $9 \pm 2\%$  after medium and  $23 \pm 2\%$  after POS pre-stimulation of sMerTK release.

## DISCUSSION

RPE cells are different from macrophages in that they are in continuous contact with POS, and phagocytosis occurs at a specific time, although macrophages must dispose of apoptotic cells as soon as they encounter them (5). Thus, activation of the machinery must be tightly controlled in the retina to trigger and achieve timely POS engulfment and limit phagocytosis duration. *In vivo*, MerTK is activated via intracellular pathways by the  $\alpha v \beta 5$  integrin receptor and its ligand MFG-E8 synchronizing POS phagocytosis to generate the distinctive peak of POS intake occurring every morning (12, 14). However, how MerTK activity is controlled to restrict the duration of the phagocytic peak, crucial in avoiding too many POS being internalized, is still unclear. We know that proper control of all steps of phagocytosis is necessary as deregulation of its completion can lead to various retinal disease phenotypes, some of them resembling age-related macular degeneration (14, 44–46). In addition, we recently showed that the MerTK receptor also bears a role in controlling POS binding aside from its indispensable role for POS internalization (37). This study provides evidence of a negative feedback mechanism that down-regulates MerTK activity during RPE phagocytosis by generation of a soluble form of the receptor.

Macrophages have been previously shown to generate sMerTK from the full-length membrane-bound receptor through a proteolytic cleavage (41). Here, we find that sMerTK is cleaved from RPE cells, and this phenomenon seems to be slightly increased in the presence of POS compared with medium change alone, an effect not observed with J774 macrophages that equally recognize and interact with apoptotic cells and POS (47). These results suggest that cleavage and release of sMerTK is intrinsic to RPE cells and is in part stimulated by POS phagocytosis. Levels of full-length receptors in cell lysates were decreased accordingly in J774 macrophages, whereas no gross difference is observed for RPE-J cells. Interestingly, RPE-J cells appear to have much less MerTK cleaved compared with macrophages, which could explain why we cannot detect any significant change in cell lysate levels. RPE-J seems to also release full-length MerTK receptors, possibly via the exocytosis of microvesicles or exosomes as was shown for some cell lines (48).

MerTK proteolysis can limit the cell phagocytic activity in different ways. In macrophages, the cleaved sMerTK receptor has a direct antagonistic role on the activity of full-length membrane-bound MerTK via its interaction with Gas6, and thus it acts as a decoy receptor (41). In our study, two approaches allowed us to show that sMerTK also acts as a decoy receptor in the retina. In RPE cells, both ligand functions are impacted by the presence of sMerTK, leading to low levels of phagocytosis. However, another effect of sMerTK release could be that proteolysis of the full-length receptor might prevent further activation of MerTK intracellular domains and thus block stimulation of downstream internalization signaling pathways. Indeed, we show that when RPE cells pre-stimulated with medium or POS to generate receptor cleavage were challenged with POS in the presence of cycloheximide to inhibit protein neosynthesis, and thus replenishment of surface-bound full-length MerTK receptors, phagocytosis was significantly reduced. This effect was also observed in cells pre-stimulated with medium alone, implying that the observed decrease in phagocytic activity of RPE cells is not due to the depletion of membrane receptors that would normally be internalized during phagocytosis but instead to the reduced availability of functional full-length MerTK receptors at the cell surface after cleavage of their ectodomain. The more pronounced effect observed after the POS preincubation step could be due to an additive effect of increased sMerTK shedding obtained as well as usage of full-length MerTK receptors during the preincubation step. Conversely, blocking cleavage of MerTK with a pharmacological protease inhibitor approach increased POS phagocytosis, especially at the binding step level, strengthening this hypothesis. Given that MerTK receptors dimerize which triggers downstream auto-phosphorylation (49, 50), it is possible that trimmed receptors lacking their extracellular C-terminal portion and still anchored at the cell surface might disrupt receptor kinase activity and/or downstream signaling by associating as dimers with available full-length, intact monomeric receptors.

Our study shows that cleavage of the extracellular portion of MerTK was inhibited with a concomitant increase in MerTK phosphorylation and hence activity when cells were incubated with TAPI-0, a nonspecific protease inhibitor, which has previ-

ously been shown to inhibit MerTK shedding in macrophages (41). Very recently, the cleavage site in mouse macrophages has been located to proline 485 in MerTK, and it has been shown that sMerTK cleavage requires the metalloprotease ADAM17 (51). Given the differences in the molecular regulation of phagocytosis and MerTK cleavage between macrophages and RPE cells, it would be interesting to investigate whether ADAM17 also participates in sMerTK release in the retina. Other candidates bearing a tissue-specific action that can be inhibited by TAPI-0 would also be candidates for investigation.

*In vivo*, we show that the release of sMerTK follows a circadian profile, decreasing slightly just before and increasing at peak phagocytosis time and during the following hour. Interestingly, peak sMerTK levels were detected at light offset, which could help keep phagocytosis down when light levels change. These results suggest that ectodomain cleavage of MerTK might function to avoid prolonged engulfment of POS and thus limit the duration of the phagocytosis peak to the narrow window that occurs just after light onset. Combined with our previous results showing the punctual intracellular stimulation of MerTK via  $\alpha\beta 5$  integrin-related signaling cues (12, 14), it appears that multiple pathways participate in the phagocytic burst in the retina, both through intra- and extracellular molecules. In the absence of MFG-E8 or  $\alpha\beta 5$  integrin, phagocytosis still occurs but on a steady-state basis, and so it is therefore important to explore the diurnal status of sMerTK in the retina of animals depleted of MFG-E8 or  $\alpha\beta 5$  integrin.

To study the possible contributions of both  $\alpha\beta 5$  integrin and MerTK ligands in MerTK ectodomain cleavage, cells were challenged with POS in the presence of MFG-E8, Gas6, and protein S, and the levels of sMerTK present in the CM and corresponding phagocytic activity were quantified. Our results show that the integrin ligand MFG-E8 increases the release of sMerTK, whereas both MerTK ligands have limited effects in comparison with POS alone. Interestingly, these results were observed even in the absence of POS, suggesting that ligand binding to both phagocytic receptors regulates MerTK cleavage even in the absence of phagocytosis. Concomitantly, the phagocytic activity profile matched the sMerTK release profile. When different doses and potential additive effects were tested in both macrophages and RPE cells, we observed very different responses between the two cell types. Macrophages reacted almost equally to all ligands at most doses, either alone or in combination, with an average 36% increase in total phagocytosis. In contrast, RPE cell total phagocytosis was markedly augmented upon increasing MFG-E8 stimulation alone or combined with Gas6 and protein S at 1–2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  concentrations (+80%). At higher doses, the MFG-E8-positive effect was counterbalanced to some extent by Gas6 and protein S. Gas6 alone bears an inhibitory role (–20%) whereas protein S alone is slightly stimulatory (+10%) with increasing concentrations, and their effects compensate each other when mixed at a 1:1 ratio. Ligand combinations and their various concentrations acted mostly on internalization, as all effects were more pronounced than on POS binding.

The important stimulatory effect of MFG-E8 on both phagocytosis and sMerTK cleavage in RPE cells points out that integrin signaling pathways synchronizing phagocytosis *in vivo* may

contribute to the release of sMerTK from the apical surface, either directly or indirectly, to help down-regulate phagocytosis. Furthermore, our results indicate that MerTK ligands Gas6 and protein S appear to have opposite and more subtle roles in the regulation of POS phagocytosis and MerTK cleavage by the RPE, which appear to be dose-dependent, at least *in vitro*. Gas6 seems to act as a negative regulator, although protein S appears to stimulate phagocytosis. As both ligands are not required for the rhythm of phagocytosis, although they are essential for phagocytosis completion (12, 22), they may contribute to the fine-tuning of MerTK activation. Thus, we postulate that ligands in the IPM may cooperate to tightly regulate numbers of full-length MerTK receptors present at the RPE cell surface that can be activated. This mechanism would allow for the precise control of POS engulfment to limit peak duration. To date, concentrations of individual ligands in the IPM *in vivo* are still unknown. Therefore, further studies that will assess the bioavailability of these three ligands throughout the light/dark cycle will be crucial for understanding the respective contribution of each ligand during POS phagocytosis *in vivo*.

In conclusion, our data show that RPE phagocytosis *in vitro* and *in vivo* is partly regulated by the proteolytic cleavage of the full-length membrane-bound MerTK receptor, which is critical for the uptake of POS. Receptor ectodomain cleavage provides a negative feedback loop in controlling timely MerTK activity. It is not uncommon that soluble receptors carry multiple roles in fine-tuning receptor function (39). This is exciting, and further work will elucidate the precise mechanisms of MerTK receptor shedding and how it modulates its own biological activity *in vivo*.

**Acknowledgments**—We thank Stéphane Fouquet (Imaging Facility, Institut de la Vision) and Quentin Rieu for help with confocal microscopy. The Institut de la Vision is funded by INSERM, Université Pierre et Marie Curie-Paris6, CNRS, and Département de Paris.

## REFERENCES

1. Rabinovitch, M. (1995) Professional and non-professional phagocytes: an introduction. *Trends Cell Biol.* **5**, 85–87
2. Strauss, O. (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* **85**, 845–881
3. Young, R. W., and Bok, D. (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J. Cell Biol.* **42**, 392–403
4. Bok, D., and Hall, M. O. (1971) The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J. Cell Biol.* **49**, 664–682
5. LaVail, M. M. (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* **194**, 1071–1074
6. Young, R. W. (1977) The daily rhythm of shedding and degradation of cone outer segment membranes in the lizard retina. *J. Ultrastruct. Res.* **61**, 172–185
7. Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., and Haslett, C. (1990) Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* **343**, 170–173
8. Boesze-Battaglia, K., and Albert, A. D. (1992) Phospholipid distribution among bovine rod outer segment plasma membrane and disk membranes. *Exp. Eye Res.* **54**, 821–823
9. Ruggiero, L., Connor, M. P., Chen, J., Langen, R., and Finnemann, S. C. (2012) Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not *Itgb5*<sup>−/−</sup> or *Mfge8*<sup>−/−</sup> mouse retina. *Proc.*



- Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 8145–8148
10. Ryeom, S. W., Silverstein, R. L., Scotto, A., and Sparrow, J. R. (1996) Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* **271**, 20536–20539
11. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182–187
12. Nandrot, E. F., Anand, M., Almeida, D., Atabai, K., Sheppard, D., and Finnemann, S. C. (2007) Essential role for MFG-E8 as ligand for  $\alpha\beta 5$  integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 12005–12010
13. Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D., and Rodriguez-Boulan, E. (1997) Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires  $\alpha(v)\beta 5$  integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12932–12937
14. Nandrot, E. F., Kim, Y., Brodie, S. E., Huang, X., Sheppard, D., and Finnemann, S. C. (2004) Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking  $\alpha\beta 5$  integrin. *J. Exp. Med.* **200**, 1539–1545
15. Ishimoto, Y., Ohashi, K., Mizuno, K., and Nakano, T. (2000) Promotion of the uptake of PS liposomes and apoptotic cells by a product of growth arrest-specific gene, gas6. *J. Biochem.* **127**, 411–417
16. Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G., and Schneider, C. (1993) The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative co-regulator in the blood coagulation cascade. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4976–4985
17. Hafizi, S., and Dahlbäck, B. (2006) Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J.* **273**, 5231–5244
18. Chen, J., Carey, K., and Godowski, P. J. (1997) Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* **14**, 2033–2039
19. Prasad, D., Rothlin, C. V., Burrola, P., Burstyn-Cohen, T., Lu, Q., Garcia de Frutos, P., and Lemke, G. (2006) TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol. Cell. Neurosci.* **33**, 96–108
20. Hall, M. O., Prieto, A. L., Obin, M. S., Abrams, T. A., Burgess, B. L., Heeb, M. J., and Agnew, B. J. (2001) Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Exp. Eye Res.* **73**, 509–520
21. Hall, M. O., Obin, M. S., Heeb, M. J., Burgess, B. L., and Abrams, T. A. (2005) Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **81**, 581–591
22. Burstyn-Cohen, T., Lew, E. D., Través, P. G., Burrola, P. G., Hash, J. C., and Lemke, G. (2012) Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron* **76**, 1123–1132
23. Duncan, J. L., LaVail, M. M., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yang, H., Trautmann, N., Chappelow, A. V., Feng, W., Earp, H. S., Matsushima, G. K., and Vollrath, D. (2003) An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 826–838
24. Nandrot, E., Dufour, E. M., Provost, A. C., Péquignot, M. O., Bonnel, S., Gogat, K., Marchant, D., Rouillac, C., Sépulchre de Condé, B., Bihoreau, M. T., Shaver, C., Dufier, J. L., Marsac, C., Lathrop, M., Menasche, M., and Abitbol, M. M. (2000) Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol. Dis.* **7**, 586–599
25. D'Cruz, P. M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M. T., Abderrahim, H., LaVail, M. M., and Vollrath, D. (2000) Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 645–651
26. Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., Earp, H. S., and Matsushima, G. K. (2001) Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**, 207–211
27. Vollrath, D., Feng, W., Duncan, J. L., Yasumura, D., D'Cruz, P. M., Chappelow, A., Matthes, M. T., Kay, M. A., and LaVail, M. M. (2001) Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12584–12589
28. Feng, W., Yasumura, D., Matthes, M. T., LaVail, M. M., and Vollrath, D. (2002) Mertk triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 17016–17022
29. Gal, A., Li, Y., Thompson, D. A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S. G., Apfelstedt-Sylla, E., and Vollrath, D. (2000) Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* **26**, 270–271
30. McHenry, C. L., Liu, Y., Feng, W., Nair, A. R., Feathers, K. L., Ding, X., Gal, A., Vollrath, D., Sieving, P. A., and Thompson, D. A. (2004) MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1456–1463
31. Tschernutter, M., Jenkins, S. A., Waseem, N. H., Saihan, Z., Holder, G. E., Bird, A. C., Bhattacharya, S. S., Ali, R. R., and Webster, A. R. (2006) Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene. *Br. J. Ophthalmol.* **90**, 718–723
32. Cummings, C. T., Deryckere, D., Earp, H. S., and Graham, D. K. (2013) Molecular pathways: MERTK signaling in cancer. *Clin. Cancer Res.* **19**, 5275–5280
33. Cohen, P. L., Caricchio, R., Abraham, V., Camenisch, T. D., Jennette, J. C., Roubey, R. A., Earp, H. S., Matsushima, G., and Reap, E. A. (2002) Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J. Exp. Med.* **196**, 135–140
34. Cheong, H. S., Lee, S. O., Choi, C.-B., Sung, Y.-K., Shin, H. D., and Bae, S.-C. (2007) MERTK polymorphisms associated with risk of hematological disorders among Korean SLE patients. *Rheumatology* **46**, 209–214
35. Dickhout, J. G., Basseri, S., and Austin, R. C. (2008) Macrophage function and its impact on atherosclerotic lesion composition, progression, and stability: the good, the bad, and the ugly. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1413–1415
36. Wu, Y., Singh, S., Georgescu, M.-M., and Birge, R. B. (2005) A role for Mer tyrosine kinase in  $\alpha\beta 5$  integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J. Cell Sci.* **118**, 539–553
37. Nandrot, E. F., Silva, K. E., Scelfo, C., and Finnemann, S. C. (2012) Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of  $\alpha\beta 5$  integrin. *Biol. Cell* **104**, 326–341
38. Rose-John, S., and Heinrich, P. C. (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.* **300**, 281–290
39. Heaney, M. L., and Golde, D. W. (1996) Soluble cytokine receptors. *Blood* **87**, 847–857
40. Costa, M., Bellosta, P., and Basilico, C. (1996) Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Physiol.* **168**, 737–744
41. Sather, S., Kenyon, K. D., Lefkowitz, J. B., Liang, X., Varum, B. C., Henson, P. M., and Graham, D. K. (2007) A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood* **109**, 1026–1033
42. Parinot, C., Rieu, Q., Chatagnon, J., Finnemann, S. C., and Nandrot, E. F. (2014) Large-scale purification of porcine or bovine photoreceptor outer segments for phagocytosis assays on retinal pigment epithelial cells. *J. Vis. Exp.* **94**, e52100
43. Hall, M. O., and Abrams, T. (1987) Kinetic studies of rod outer segment binding and ingestion by cultured rat RPE cells. *Exp. Eye Res.* **45**, 907–922
44. Rakoczy, P. E., Zhang, D., Robertson, T., Barnett, N. L., Papadimitriou, J., Constable, I. J., and Lai, C.-M. (2002) Progressive age-related changes similar to age-related macular degeneration in a transgenic mouse model. *Am. J. Pathol.* **161**, 1515–1524
45. Gibbs, D., Kitamoto, J., and Williams, D. S. (2003) Abnormal phagocytosis by retinal pigmented epithelium that lacks myosin VIIa, the Usher syndrome 1B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6481–6486
46. Wavre-Shapton, S. T., Tolmachova, T., Lopes da Silva, M., da Silva, M., Futter, C. E., and Seabra, M. C. (2013) Conditional ablation of the choroideremia gene causes age-related changes in mouse retinal pigment epithelium. *PLoS ONE* **8**, e57769
47. Finnemann, S. C., and Rodriguez-Boulan, E. (1999) Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha v\beta 5$  integrins, and protein kinase C regulates  $\alpha v\beta 5$  binding and cytoskeletal linkage. *J. Exp. Med.* **190**, 861–874

## MerTK Cleavage Regulates RPE Phagocytosis

48. Raposo, G., and Stoorvogel, W. (2013) Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383
49. Ling, L., Templeton, D., and Kung, H. J. (1996) Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 18355–18362
50. Tibrewal, N., Wu, Y., D'mello, V., Akakura, R., George, T. C., Varnum, B., and Birge, R. B. (2008) Autophosphorylation docking site Tyr-867 in Mer receptor tyrosine kinase allows for dissociation of multiple signaling pathways for phagocytosis of apoptotic cells and down-modulation of lipopolysaccharide-inducible NF- $\kappa$ B transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* **283**, 3618–3627
51. Thorp, E., Vaisar, T., Subramanian, M., Mautner, L., Blobel, C., and Tabas, I. (2011) Shedding of the Mer tyrosine kinase receptor is mediated by ADAM17 protein through a pathway involving reactive oxygen species, protein kinase C $\delta$ , and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). *J. Biol. Chem.* **286**, 33335–33344

### 3. Discussion

Nous avons montré que MerTK est clivé *in vivo* de façon rythmique libérant dans la MIP son ectodomaine, sMerTK. Nos données suggèrent que ce clivage pourrait permettre d'éviter une internalisation trop prolongée des SEP dans l'EPR, ce qui pourrait contribuer à limiter en partie le pic de phagocytose dans le temps.

Nous avons également étudié l'effet des ligands solubles sur le clivage de MerTK et la capacité phagocytaire des cellules d'EPR. MFG-E8 stimule fortement la phagocytose et le clivage de MerTK, suggérant un rôle supplémentaire de l'intégrine  $\alpha\beta 5$  dans la régulation de la phagocytose rétinienne. Dans un premier temps, la liaison de l'intégrine à son ligand MFG-E8 permet l'initiation du pic de phagocytose via l'activation de MerTK. Dans un second temps, cette activation de MerTK pourrait induire de manière indirecte son clivage. En ce qui concerne les ligands de MerTK, Gas6 et Protéine S, nos résultats semblent indiquer que les effets de ces deux ligands sont opposés. Gas6 présente un effet inhibiteur, tandis que Protéine S présente un effet stimulateur. Nous pensons que ces deux ligands permettraient de réguler finement la quantité de MerTK disponible à la surface cellulaire en agissant sur son clivage. Ainsi, nous avons voulu 1- caractériser l'expression de ces ligands *in vivo* au cours du cycle circadien et 2- identifier leurs domaines de fixation sur MerTK.

## II. Régulation de MerTK via ses ligands

### 1. Introduction

Dans la partie précédente des résultats, nous avons montré que, comme chez les macrophages, la fonction de MerTK est régulée en partie par son clivage, qui dans la rétine libère son ectodomaine, sMerTK, dans la MIP de manière rythmique *in vivo* (Law et al., 2015). Nous avons également montré que contrairement aux macrophages, des doses croissantes de Gas6 et Protéine S ont des effets opposés sur la capacité phagocytaire des cellules RPE-J et sur le clivage de MerTK, suggérant que Gas6 et Protéine S possèdent des rôles différents pour la régulation de l'activité de MerTK dans la phagocytose rétinienne.

Nous avons donc analysé le profil d'expression des gènes et des protéines de ces deux ligands à différentes heures au cours du rythme circadien chez des souris contrôles et chez les souris intégrine  $\beta 5$  knockout pour lesquelles le rythme de phagocytose est abrogé. De plus, les récepteurs TAM possédant deux sites de liaison putatifs pour leurs ligands extracellulaires, nous avons étudié par une approche de mutagenèse dirigée si Gas6 et Protéine S peuvent se lier aux mêmes sites ou s'il existe une préférence entre ces deux sites ou sur certains acides aminés pour chaque ligand (Sasaki et al., 2006).

### 2. Résultats

L'expression de *Gas6* varie peu au cours du cycle jour–nuit dans l'EPR/choroïde et dans la rétine. L'analyse de la quantité de la protéine Gas6 dans ces deux tissus montre que dans l'EPR/choroïde, sa quantité varie peu au cours de la journée et est faible juste avant le pic de phagocytose. Dans la rétine, la quantité de Gas6 semble varier plus que dans l'EPR/choroïde. L'expression de *Protéine S* dans l'EPR/choroïde est importante juste avant le pic de phagocytose et 2 heures après l'extinction de la lumière. Dans la rétine son expression est plus importante au moment du pic de phagocytose et de l'extinction de la lumière. La quantité de Protéine S dans la MIP est stable au cours de la journée sauf au moment du pic de phagocytose où une nette augmentation est observée.

Nous avons également analysé les profils d'expression des gènes *Gas6* et *Protéine S* chez les souris déficientes pour l'intégrine  $\beta 5$ , qui ne présentent pas de rythme circadien pour la phagocytose et qui développent une perte visuelle avec l'âge. Nous n'avons pas détecté de changement important dans le profil d'expression de *Gas6* à la fois dans la rétine et dans

l'EPR/choroïde. Par contre pour *Protéine S*, de nombreux pics d'expression présents chez les souris contrôles dans l'EPR/choroïde sont perdus ou décalés de 2 heures et sont plus faibles. Nous avons également analysé le profil d'expression du gène *MerTK* dans l'EPR/choroïde chez les souris déficientes pour l'intégrine  $\beta 5$ . La rythmicité de son expression est complètement perdue et *MerTK* est beaucoup moins exprimé que chez les souris contrôles.

La mutation des acides aminés sur le site de liaison mineur de MerTK n'a pas d'effet sur la capacité phagocytaire des cellules RPE-J. En présence de Protéine S, le mutant p.Gly122Arg au niveau du site majeur de fixation induit une diminution de la liaison et une forte augmentation de l'internalisation, suggérant une accélération de la phagocytose. Les deux autres mutants testés sur ce site majeur, p.Thr145Ala et p.Phe147Val, induisent une diminution de l'internalisation en présence de Gas6.

Ces résultats sont présentés dans l'article ci-après « Differential expression and binding of MerTK ligands Gas6 and Protein S during retinal phagocytosis » par C Parinot *et al*, qui est en cours de préparation pour soumission au *Journal of the European Molecular Biology Organization* dans lequel je serai premier auteur.

## **Differential expression and binding of MerTK ligands Gas6 and Protein S during retinal phagocytosis**

Célia Parinot<sup>1A,1B,1C</sup>, Jonathan Chatagnon<sup>1A,1B,1C</sup>, Quentin Rieu<sup>1A,1B,1C</sup>, Dorine Néel<sup>1A,1B,1C</sup> and Emeline F. Nandrot<sup>1A,1B,1C</sup>

<sup>1A</sup> INSERM, U968, <sup>1B</sup> UPMC Univ Paris 06, UMR\_S968, Institut de la Vision, <sup>1C</sup> CNRS, UMR\_7210, 17 rue Moreau, Paris, F-75012, France

**Corresponding author:** Emeline F. Nandrot, E-mail: [emeline.nandrot@inserm.fr](mailto:emeline.nandrot@inserm.fr), Institut de la Vision, 17 rue Moreau, Paris, F-75012, France. Phone. +33-1-5346-2541, Fax. +33-1-5346-2602.

**Running title :** Gas6 and Protein S roles in retinal phagocytosis

**Abstract**

Daily rhythmic phagocytosis of oxidized photoreceptor outer segments constitutes one of the main tasks of cells from the retinal pigment epithelium. Engulfment of shed outer segments portions is taken over by the MerTK receptor. MerTK and both its cognate ligands Gas6 and Protein S are required for vision as their absence leads to early-onset photoreceptor degeneration. We previously showed that MerTK ligands carry opposite role *in vitro*, Gas6 contributing to MerTK cleavage and inhibiting internalization while Protein S acts conversely. So far, their exact role *in vivo* has not been explored. We presently show that *in vivo* Protein S mRNA and protein expression profiles follow a rhythmic pattern close to phagocytosis while Gas6 expression is more stable. Using site-directed mutagenesis and phagocytosis assays we demonstrate that Gas6 and Protein S recognize different amino acids on MerTK second Ig-like domain. Taken together, our data suggest that Gas6 and Protein S opposite effects may be explained by different *in vivo* expression patterns combined with separate binding sites that could influence the activity of MerTK opposite ways.

**Keywords :** diurnal phagocytosis / Gas6 / MerTK / Protein S / retinal pigment epithelium

## **Introduction**

In the retina, daily vision is initiated in the photosensitive photoreceptor outer segments (POS) where light is absorbed and also induces oxidative damage. Being post-mitotic cells, photoreceptors replace permanently their POS and shed daily their aged extremities. Separated POS are readily and rhythmically eliminated through a phagocytic mechanism by cells from the adjacent retinal pigment epithelium (RPE) (Young & Bok, 1969). This daily activity of also post-mitotic RPE cells has a maximum of activity two hours after light onset (LaVail, 1976). Completion of phagocytosis is key to photoreceptor function and survival as its absence causes to rapid photoreceptor degeneration (Bok & Hall, 1971). Similarly, maintenance of its daily rhythm is critical as arrhythmic phagocytosis leads to accumulative processes and age-related vision loss (Nandrot et al. 2004).

Similarly to the elimination of apoptotic cells (AC) by macrophages, RPE phagocytosis is a very organized process that follows sequential steps. First, AC and POS are respectively recognized by  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  integrin receptors (Savill et al, 1990; Finnemann et al, 1997) via MFG-E8, a soluble ligand in the extracellular matrix that targets the phosphatidylserines (PtdSer) exposed at their cell surface (Hanayama et al, 2002; Nandrot et al, 2007). In the retina, increased exposure of PtdSer and activity of the  $\alpha v \beta 5$  integrin–MFG-E8 couple are responsible for the synchronized burst of POS phagocytosis after light onset (Ruggiero et al, 2012; Nandrot et al, 2004; Nandrot et al, 2007). After target tethering, intracellular signaling pathways lead to cytoskeletal rearrangements (Mao & Finnemann, 2012), phagosome closure (Strick et al, 2009; Bulloj et al, 2013) and internalization (Finnemann, 2003; Nandrot et al, 2004). Second, internalization requires the Mer tyrosine kinase (MerTK) receptor (Scott et al, 2001), which absence results in early-onset photoreceptor death due to accumulation of shed POS in rodents (Nandrot et al, 2000; D'Cruz et al, 2000; Duncan et al, 2003). Deregulation of MERTK function linked to gene mutations or overexpression lead to various pathologies in Humans, ranging from retinal dystrophies (Gal et al, 2000; McHenry et al, 2004; Tschernutter et al, 2006) to lupus-like autoimmune phenotypes (Cheong et al, 2007), atherosclerosis (Dickhout et al, 2008) and cancers (Cummings et al, 2013). MerTK has also been shown to regulate the amount of AC and POS linked to the cell surface and that can thus be engulfed (Wu et al, 2005; Nandrot et al, 2012), and it can sometimes work without the intervention of integrins (Dransfield et al, 2015).

MerTK is one of the three receptors of the TAM family, named after Tyro3, Axl and MerTK (Hafizi & Dahlbäck, 2006a). TAM receptors share very close structural features, with an extracellular domain build of two immunoglobulin-like domains and two type III fibronectin repeats, a short transmembrane domain and a large cytoplasmic tyrosine kinase domain. All three receptors seem to be implicated in general homoeostasis of tissues via their role in removing every day numerous loads of AC throughout the body as well as in the downregulation of inflammatory responses in the innate immune system (Lemke, 2013).



However, at the functional level, specificities exist: in macrophages MerTK functions as a tolerogenic receptor, while Axl is mobilized by proinflammatory molecules (Zagorska et al, 2014). TAM receptors expression can also be tissue-specific: indeed, in the retina, only MerTK and Tyro3 are expressed (Prasad et al, 2006).

TAM receptors share two cognate ligands, the vitamin K-dependent Gas6 and Protein S (Stitt et al, 1995; Varnum et al, 1995), that also bear some typical characteristics. While their molecular structure is very similar (Manfioletti et al, 1993) with a series of one Gla domain for PtdSer binding, 4 EGF-like domains and a Sex-Hormon-Binding Globulin domain for receptor binding (Hafizi & Dahlbäck, 2006b), they are used in distinct functions. Beside its important role in the anticoagulation cascade (Walker et al, 1980), Protein S is associated with atherosclerosis via its stimulation of oxLDL phagocytosis by macrophages (Liao et al, 2009), with angiogenesis via both Axl and MerTK (Burstyn-Cohen et al, 2009; Korshunov et al, 2006) and with the development of cancers (Suleiman et al, 2013). The Gas6–Axl complex has also been linked to inhibition of angiogenesis (Gallicchio et al, 2005).

Importantly, Protein S is implicated in AC clearance by macrophages (Anderson et al, 2003). First linked to PtdSer, Protein S binds to TAM receptors and mediate their activation by inducing receptor dimerization and autophosphorylation (Uehara & Shacter, 2008). Gas6 has the capability to bind PtdSer as well and stimulates receptor activation (Nakano et al, 1997; Hall et al, 2002), and but its precise role in apoptotic cell clearance is not clear. Its absence does not lead to any phenotype in mice, and Protein S is sufficient to elicit phagocytosis (Prasad et al, 2006; Lew et al, 2014). Both Gas6 and Protein S have been shown to stimulate POS phagocytosis by RPE cells (Hall et al., 2005) and are expressed in the retina (Prasad et al, 2006). However, only recently the creation of a mouse model inactivated for both Gas6 and Protein S that develops blindness similarly to MerTK-deficient rats or mice made it clear that both ligands are required in the retina (Burstyn-Cohen et al, 2012).

MerTK activation shown by its phosphorylation profile presents a maximum of activity at the time of phagocytic peak (Nandrot et al, 2004). Interestingly, in  $\beta 5$  integrin and Mfg-e8 knockout mouse eyes, both peaks of phagocytosis and MerTK activation are lost but phagocytosis still exists (Nandrot et al, 2004; Nandrot et al, 2007) suggesting that MerTK might be stimulated by Gas6 and/or Protein S directly. RPE cells are in permanent contact with POS and the timeframe of peak MerTK phosphorylation is very sharp, thus MerTK activation has to be regulated very tightly to avoid too much phagocytosis to occur. Our recent data showed that MerTK function might be controlled by cleavage of its ectodomain and release of soluble MerTK (sMerTK) in the extracellular matrix both *in vitro* and rhythmically *in vivo* (Law et al, 2015). Surprisingly, and in contrast to macrophages, increasing doses of Gas6 and Protein S have opposite effects on sMerTK release and POS phagocytosis. While Gas6 appears to increase sMerTK release and block phagocytosis Protein

S had the converse effects. These data suggest that both ligands might bear different roles in regulating MerTK function in the retina.

Therefore, we analyzed the mRNA and protein expression profiles of Gas6 and Protein S along the light:dark cycle. We show that Protein S expression varies according to light onset/offset and around the time of the phagocytic peak, while Gas6 expression is more stable. We also asked whether both ligands were sharing the same binding site on MerTK or whether they each had a specific one. Our mutagenesis approach combined to phagocytosis assays suggest that each ligand seem to recognize different amino acids of the major ligand binding site. Taken together, our results allow us to understand how the retina-specific opposite effect of Gas6 and Protein S on the regulation of MerTK function is organized at the molecular level.

## **Results**

### ***Gas6 expression profile along the light:dark cycle is quite stable***

Expression of *Gas6* (Table I) along the light:dark cycle appears as slightly rhythmic in wildtype animals with small increases just before light onset and after the phagocytic peak in the RPE/choroid fraction and during the phagocytic peak in the retina fraction (Fig. 1A). Corresponding protein levels in the RPE/choroid were stable whereas retinal samples showed some rhythmicity like the qPCR profile but even at times not related to phagocytosis (Fig. 1B). Respective gene expression levels are higher in the retina samples, containing more varieties of cells, than in the RPE/choroid (Fig. 1C).

We evaluated the bioavailability of Gas6 by studying the soluble ligands that were present in the IPM. Immunoblots and ELISA assays confirmed the small variation in Gas6 expression profile (Fig. 1D). For the first time, we quantified *in vivo* the amounts of Gas6 ligand that can be used to recognize POS and activate MerTK at different times of day, ranging from 0.3 (just before the phagocytic peak) to 0.6 (2 hours after light onset) ng/mL. We investigated whether these expression levels were modified in beta5 integrin knockout mice whose phagocytosis is arrhythmic (Nandrot et al, 2004). We did not detect any drastic change in the expression profiles of *Gas6* in the RPE/choroid or the retina (Fig. 1E).

### ***Protein S expression profile peaks just before and at the time of the phagocytic peak***

The same samples were used to assess expression of Protein S at the gene and protein levels. Protein S has been shown as being transcribed by both photoreceptor and RPE cells (Prasad et al, 2006). We could detect a bimodal profile of *Protein S* synthesis in both the RPE/choroid, at the time of light onset and after light offset, and in the retina, at peak phagocytic time and at light offset (Fig. 2A). Protein levels recapitulated the retinal profile but expression of Protein S in RPE/choroid seemed shifted 3 hours later compared to gene expression (Fig. 2B). As shown for *Gas6*, *Protein S* is more expressed in the retina, possibly due to the high number of blood vessel spanning the retinal network (Fig. 2C).

We could find any ELISA kit that gave us consistent measures of Protein S concentration in our samples therefore we only used immunoblots for soluble Protein S quantifications. Amounts of Protein S available in the IPM are markedly and solely increased at the time of the phagocytic peak when compared to any other time of the day (Fig. 2D). Interestingly, in beta5 integrin knockout mice some of the peaks of *Protein S* expression observed in wildtype controls are lost (Fig. 2E): at light onset and after light offset in the RPE/choroid, and at peak phagocytosis time in the retina.

We showed previously that *MerTK* is also expressed under a rhythmic pattern, including low gene transcription at peak time, followed by a sharp increase just after the peak (Law et al, 2015). We now illustrate the complete loss of *MerTK*'s rhythmic expression when phagocytosis is performed as a steady-state function in beta5 integrin knockout RPE/choroid (Fig. 2F).

### ***Expression levels and effect of inhibition are different for Gas6 and Protein S***

Our recent data suggest that, in contrast to macrophages, *Gas6* and Protein S assume converse roles in POS phagocytosis (Law et al, 2015). Increasing doses of *Gas6* inhibit POS internalization while doses of Protein S stimulate POS engulfment. Another study showed that both ligands are required for phagocytosis completion (Burstyn-Cohen et al, 2012). Therefore, respective amounts of each ligand in the IPM at any given time of the day is important to control this rhythmic activity. At the gene level, *Gas6* is substantially more expressed than *Protein S* at any given time in both RPE/choroid and retina (Fig. 3A). Immunofluorescence assays confirmed that both ligands are detected in the IPM, RPE and photoreceptors (Fig. 3B).

We tested the effect of blocking the endogenous expression of each ligand or both via siRNA on the phagocytic abilities of rat RPE-J cells without the addition of ligands to the medium. Decreasing *Gas6* expression directly impacts significantly both steps of phagocytosis, binding and internalization after 1.5 and 3 hours of POS challenge (Fig. 3C-D). Protein S

downregulation slightly impacted binding and only after 1.5 hours of phagocytosis (Fig. 3C). No additional effect is gained of blocking expression of both ligands at the same time compared to Gas6 alone. We noticed that the effects are more marked early on at 1.5 hours than after 3 hours of phagocytosis (Fig. 3C-D).

### ***Gas6 and Protein S recognize different amino acids of MerTK major binding site***

In the TAM family, only the binding between Gas6 and Axl has been studied (Sasaki et al, 2006). Using crystallography analysis of ligand–receptor interaction and mutagenesis, they identified a minor and a major binding site on Axl and showed that Gas6 binding to an Axl monomer elicits dimerization and activation of the receptor. Between members of the TAM family, it appears that the major site is more prone to receptor specificity. We decided to explore these 2 sites on the MerTK receptor regarding the binding of Gas6 and Protein S. For each site, we chose 3 relevant amino acids to target referring to residues important to Axl (Sasaki et al, 2006) and sequence homologies between Axl and MerTK. Amino acids were changed so that the new residue does not affect the overall 3-D structure of the extracellular domain (similar size and chemical properties) (Table II).

Mutated *MerTK* clones were transfected in RPE-J cells, containing normal endogenous MerTK. In our first series of assays, cells were challenged with POS alone (Fig. 4A). The negative control mutant p.Pro120Arg has the same phagocytic profile as the wildtype *MerTK* construct. Among the 2 mutants tested for each site, the major site p.Thr145Ala and p.Lys269Leu seem to modify both steps RPE-J phagocytosis, with a bigger effect on POS binding. To test the binding affinity of each ligand on the mutants, we added either ligand alone or in combination to the POS mix (Law et al, 2015). Mutants in the minor site do not lead to any functional change in the presence or absence of ligands when compared to the wildtype construct (data not shown). Major site mutant have a more stringent effect on POS phagocytosis (Fig. 4B). In the presence of Protein S, the p.Gly122Arg mutant shows decreased binding and increased internalization, suggesting acceleration of phagocytosis, that is even more pronounced when Gas6 is also added. The 2 other mutants tested p.Thr145Ala and p.Phe147Val, which are very close residues, impacted POS internalization in the presence of Gas6.

## **Discussion**

Retinal phagocytosis and clearance of apoptotic cells by macrophages share common features, which allows us to make analogies: sequential organization of the process, similar molecular machinery, cross-recognition of each other's target (Finnemann et al, 1999). However, in the retina the situation is way more complex due to the permanent contact between the 2 protagonists. This characteristic makes it necessary for RPE cells to have a perfect control of the amounts of POS they engulf to avoid achieving too much phagocytosis and damaging the homeostasis of the retina. The converse limitation is also crucial: RPE cells need to eliminate damaged POS properly in order to maintain photoreceptor's health and vision (Bok & Hall, 1971). Therefore, RPE phagocytosis functions as a once-a-day event, a burst of activity that occurs during a limited time lapse. At light onset, a series of events are taking place leading to the stimulation of MerTK, which phosphorylation profile over a short duration matches the peak of POS engulfment (Nandrot et al, 2004). MerTK gene expression is also rhythmic, with a burst of synthesis just after phagocytosis and after light offset. We now show that in beta5 integrin knockout mouse the rhythm of POS clearance is lost, as well as the cyclic profile of MerTK expression in RPE/choroid samples. This suggests that the rhythmicity of POS elimination somehow is required for rhythmic MerTK transcription.

Aside from its extracellular activation via alphavbeta5 integrin receptors, there are several ways by which MerTK activity can be controlled. One of them is the stimulation by its 2 ligands Gas6 and Protein S. Both seem to be expressed by photoreceptors as well as by the RPE (Hall et al, 2005; Prasad et al, 2006). For a long time, doubts were lingering about the *in vivo* utility of MerTK ligands for retinal phagocytosis. Indeed, despite the fact that they have been shown to stimulate POS phagocytosis by RPE cells *in vitro* (Hall et al, 2005), their absence in single mutant mice does not lead to any ocular phenotype (Hall et al, 2005; Prasad et al, 2006; Burstyn-Cohen et al, 2012). Recently, the generation of Gas6 and Protein S double knockout mice finally gave us some more insight (Burstyn-Cohen et al, 2012). These animals develop the same early-onset retinal degeneration phenotype as MerTK-deficient rats and mice (Nandrot et al, 2000; D'Cruz et al, 2000; Duncan et al, 2003). These results clearly demonstrated that both ligands are required *in vivo*, and suggested some compensatory mechanism in the absence of one of the two ligands.

Therefore an important question arises: *in vivo* where and when are MerTK ligands expressed and bioavailable? For the first time, in our study we extensively analyzed expression of these ligands at the gene and protein levels in separated retina and RPE/choroid fractions as well as in the IPM in wildtype mice as well as in a mouse model displaying an arrhythmic profile of retinal phagocytosis (beta5 integrin knockout mouse). Gas6 expression profiles in normal animals only showed a slight decrease just before followed by an increase just after phagocytosis. In contrast, Protein S expression profiles are more variable, with increased production just before (RPE/choroid) or at the time (retina) of peak phagocytosis. Protein S

ligands available in the IPM have a sharp increase in their concentration just at the time of maximum POS elimination. In the retina of *beta5* knockout mice, *Gas6* profiles are pretty similar to controls, while some of the expression peaks are lost for Protein S. This result implies that some components regulating Protein S expression might be directly linked to the phagocytic function like it seems to be the case for MerTK. Taken together *Gas6* appears to follow a quite stable expression profile, while Protein S one is matching and partly linked to phagocytosis, both in photoreceptors and in RPE cells. Therefore, we still cannot discriminate on the origin of the bioactive Protein S between these 2 cell types.

Interestingly, when we compared the relative amount of gene transcription between the 2 ligands, *Gas6* is expressed between 15% (retina) to 40% (RPE/choroid) more on average than *Protein S*. This raises a very important point: knowing the respective concentrations of each ligand during the light:dark cycle. We were able to evaluate the amounts of *Gas6* in the IPM in the ng/mL scale in the mouse using ELISA kits. Unfortunately, we could not identify any kit accurate enough to quantify Protein S concentrations in our mouse samples. However, at the transcriptional level there seems to be excess of *Gas6* production compared to Protein S during the majorite of the light:dark cycle. While their half-lives are not known, it is known that the affinity of MerTK for *Gas6* is weak (Sasaki et al, 2006). Therefore, the abrupt increase of Protein S availability at peak phagocytosis time might change the stoichiometry between the 2 ligands for binding and activation of MerTK receptors. The change in the type of ligand binding the receptor could also modify its 3-D structure and thus its activity. As well, it has been shown that calcium ions and gamma-carboxylation of the Gal domain of the ligand is required for full activation of TAM receptors (Hall et al, 2002; Lew et al, 2014). Therefore, some other factors in the extracellular matrix might participate in the process.

So far, the exact binding site/s for *Gas6* and Protein S on MerTK have never been explored in any tissue. Using sequence comparisons between TAM receptors and a previous study on Axl binding sites (Sasaki et al, 2006), we selected probable amino acids for ligand binding in the putative minor and major sites on the extracellular domains of MerTK. To assess these residues, we used a site-directed mutagenesis approach combined with phagocytosis assays with or without the addition of MerTK ligands. For POS phagocytosis only the major site seems to be mobilized. Interestingly, *Gas6* and Protein S act on different amino acids, raising the doubt for the potential competition between the 2 ligands. Although it has not been explored, it might be possible that both ligands could be attached on a MerTK dimer.

Recently, we identified another mean RPE cells use to regulate MerTK activity. We showed that RPE cells cleave the extracellular domain of MerTK from the cell surface and release it as a soluble receptor (sMerTK) in the extracellular matrix that can act as a decoy receptor, leading to decreased phagocytosis (Law et al, 2015). This downregulation mechanism seems to be linked to *Gas6*, which stimulates MerTK cleavage while Protein S tends to inhibit it. Differential anchoring of one or the other ligand might elicit different signal that could engage

MertK in the cleavage process via a more easy access of proteases to the cleavage site next to the cell membrane and thus downregulate phagocytosis. In addition, while Protein S stimulates POS phagocytosis as it does in macrophages, increasing doses of Gas6 inhibited the internalization of POS. Blocking the endogenous production of Gas6 decreased phagocytosis, suggesting that there might be a different role of Gas6 produced by RPE cells and of the recombinant one we use in phagocytosis assays.

Thus, the results of this study reinforce our previous work (Law et al, 2015). When combining our *in vitro* and our *in vivo* data, we can make some hypothesis on the role of MerTK ligands in the fine regulation of the receptor's activity. In the retina, Gas6 and Protein S appear to bear opposite roles on RPE cells. Gas6 seems to sustain a continuous inhibitory role through its high almost constant expression in the retina. In contrast, Protein S appears to help stimulate MerTK at the time of phagocytosis peak activity when its presence in the IPM increases. Therefore, Protein S appears as the probable MerTK ligand for rhythmic phagocytosis, even if both ligands are required for photoreceptor survival (Burstyn-Cohen et al, 2012). Their differential role on phagocytosis modulation might be ensured by the use of separate fixation sites on the Ig-Like domains of MerTK, and it might be linked to MerTK cleavage. Further studies are required in order to identify the protease/s cleaving MerTK.

## **Materials and Methods**

### ***Reagents and Antibodies***

Reagents were from Life Technologies, unless otherwise stated. Gas6 and MerTK recombinant proteins and antibodies raised in goats against Gas6, MerTK, PEDF and Protein S were from R & D Systems. Recombinant Protein S was from MP Biomedicals. Protein S in *in vivo* samples were detected on immunoblots using the mouse Protein S antibody (Abcam).

### ***Animals***

Homozygous  $\beta 5$  integrin knockout mice ( $\beta 5^{-/-}$ ) (Huang et al, 2000; Nandrot et al, 2004) and wildtype (wt) mice from the same genetic background (129T2/SvEmsJ; The Jackson Laboratory) were housed under cyclic 12-hr light:12-hr dark conditions (light onset at 8AM) and fed *ad libitum*. Animals were handled according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Protocols were approved by the Charles Darwin Animal Experimentation Ethics

Committee from the Université Pierre et Marie Curie-Paris. For experiments, wt and  $\beta 5^{-/-}$  mice aged from 2 to 4 months were killed by CO<sub>2</sub> asphyxiation. Mice were sacrificed at 12 different time-points along the light:dark cycle as follows: 4.00, 6.00, 7.00, 8.00 (light onset), 9.00, 10.00 (phagocytosis peak), 11.00, 12.00, 16.00, 20.00 (light offset), 22.00 and 24.00. Eyes were gently removed and dissected in HBSS without CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>. After removal of the lens, the retina was carefully separated from the rest of the cup –containing the RPE/choroid– in a dry dish and both parts were frozen separately in liquid nitrogen. One eye (cup and retina) from each animal was used for gene expression levels assessment and the fellow eye for protein levels analysis (see respective sections below).

### ***RNA extraction, reverse transcription assay and Real-time quantitative PCR***

RNAs were extracted using the Illustra RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare) according the manufacturer's instructions with a second DNase step to reduce the potential residual content of genomic DNA as previously described (Law et al, 2015). RNA yield and purity were measured using a spectrophotometer. 250 ng of total RNAs from each sample were loaded on a 1% agarose/1X TAE gel to check their integrity. 500 ng of total RNAs from both retina and RPE/Choroid of each eye were reverse-transcribed in a 50- $\mu$ L final reaction volume for 1 hour at 42°C (Reverse Transcription System, Promega).

PCR primers designed by us allow the amplification of 150-bp fragments for all tested genes and the *ribosomal protein Rho0 (Rplp0)* housekeeping control (Table I). Triplicate qPCR reactions for each sample were carried out on a 7500 Fast Real-Time PCR System using the Power SYBR Green PCR Master Mix (both Applied Biosystems) as follows: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 sec, 60°C for 1 min. Reaction products were tested on 1.2% agarose/1X TAE gel electrophoresis and melting curves were analyzed to confirm size and specificity, respectively. Relative amounts of each gene were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method and expression levels at 8 AM (8.00, light onset) were set as 1 as specified in each figure legend.

### ***Retrieval of Soluble Proteins, Sample Lysis, Immunoblotting and ELISA***

Soluble proteins from the interphotoreceptor matrix (IPM) of mouse eyes were isolated from each sample in HBSS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> for 20 min on a shaker at 4°C as described previously (Law et al, 2015). Samples were centrifuged at maximum speed for 5 min at 4°C and then supernatants were ultra-centrifuged at 110,000g for 30 min at 4°C (Sorvall M120 SE Discovery, S120-AT2 rotor).

Tissue pellets were solubilized in 1% Triton X-100, 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EGTA with 1 % each



of protease and phosphatase inhibitor cocktails. Isolated samples representing 20% of soluble proteins from the IPM mixed at 1:1 between separated retina and RPE/Choroid fractions from a same sample and whole cell lysates representing approximately 7.5% of one tissue sample were separated on SDS-polyacrylamide gels and electroblotted onto nitrocellulose membrane (Whatman). Immunoblots were blocked with 10% milk in 1X TBS for 2 hours, probed with primary antibodies overnight and secondary antibodies for 2 hours at RT. Signals were detected using a chemiluminescence detection system (PerkinElmer) and chemiluminescence films (Amersham). Non-saturated films were scanned and signals quantified using NIH ImageJ 1.43u. An identical control sample was loaded on each immunoblot and used as reference for protein quantifications and comparisons between different sample series.

Amounts of Gas6 ligands present as soluble molecules in the IPM were assessed using the corresponding Mouse Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) as instructed. For each sample, 9 µg of each separated retina and RPE/Choroid fractions were mixed before measurement on a plate reader at 450 nm with a correction at 540 nm. Concentrations were calculated according to the standard control values.

### ***Immunofluorescence Microscopy***

Full eyecups were fixed in Davidson's fixative (3/9 ethanol 95%, 1/9 glacial acetic acid, 2/9 37% formaldehyde solution, 3/9 distilled water), lens removed and eyecups embedded in paraffin. 8-µm cross-sections were cut and paraffin was removed using SafeSolv. Rehydrated sections were incubated in 9% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 1X SSC and deionized formamide for 20 min under a fluorescent bulb to bleach melanin pigments. Non-specific signals were blocked using 1% BSA in 1X TBS for 30 minutes. Sections were incubated overnight at 4°C with the different primary antibodies. After 3 10-min washes in 1% BSA 1X TBS, sections were incubated with AlexaFluor secondary antibodies diluted in 1% BSA 1X TBS for 1.5 hours, washes 3 times, incubated with DAPI for 15 minutes, washed again twice and the slides were mounted with Vectashield (Vector Laboratories). Fluorescent images were acquired using a DM6000 epifluorescence microscope (Leica) with a 20X objective and the Meta Imaging Series 7.5 (Metamorph) software. Images were compiled and processed similarly using Adobe Photoshop CS, version 8.0.1.

### ***MerTK cDNA Mutagenesis***

Mouse *MerTK* cDNA with an extracellular GFP tag cloned into the OmicsLink Expression Clone vector (EX-Mm03855-M29) was purchased from GeneCopoeia. Point mutations on the minor and major site were designed according to critical amino acids for ligand binding identified on Axl in a previous study (Sasaki et al, 2005) and using sequence alignments

between Axl and MerTK. Primers sequences were generated using the QuickChange Primer Design Program ([www.agilent.com/genomics/qcpd](http://www.agilent.com/genomics/qcpd); Agilent Technologies) (Table II). Desired changes were obtained using the QuickChangeII XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) with the following PCR amplification conditions: 5 min at 95°C; 18 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 60°C and 22 min at 68°C; 7 min at 68°C. Selected clones were confirmed via direct sequencing and were further amplified to generate stock.

### ***Cell Culture and Transfection***

The rat RPE-J cell line (ATCC) was maintained at 32°C and 5% CO<sub>2</sub> in DMEM with 4% CELlect Gold FCS (ICN), supplemented with 10 mM HEPES and 1% non-essential amino acids (NEAAs). For experiments, RPE cells were plated on alcian blue-coated 96-well plates. After 24 hours, cells were transfected with expression plasmids for 5 hours using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) according to the manufacturer's protocols, and used 72 hours later. Alternatively, cells were transfected with rat ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs for 4 hours using the DharmaFECT 4 siRNA Transfection Reagent as instructed. Transfection efficiency was assessed using the siGLO RISC-free Control siRNA and specificity of the effects observed was validated by comparison with the ON-TARGETplus Non-targeting Pool (all from Dharmacon).

### ***POS Isolation and phagocytosis***

POS were isolated from porcine eyes fresh from the slaughterhouse according to an extensively described protocol (Parinot et al, 2014). Under dim red light in the dark, eyeballs were separated into anterior and posterior halves, and retinae were collected in an homogenization buffer (20% sucrose, 20 mM tris acetate pH 7.2, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 5 mM taurine). The retina suspension was shaken vigorously to disrupt the cells and detach the outer segments and filtered 3 times through gauze. The retinal homogenate was loaded onto continuous 25-60% sucrose gradients (in tris acetate pH 7.2, 10 mM glucose, 5 mM taurine) and ultracentrifuged at 25,000 rpm for 50 min at 4°C (Beckman SW-32-Ti swing rotor). The orange band in each tube was collected and diluted in 4-5 volumes of a 20 mM tris acetate pH 7.2, 5 mM taurine buffer, and spun at 5,000 rpm for 10 min at 4°C (Sorvall SS34 rotor). Pellets were washed in 10% sucrose, 20 mM tris acetate pH 7.2, 5 mM taurine, pelleted similarly, washed in 10% sucrose, 20 mM sodium phosphate pH 7.2 and 5 mM taurine and centrifuged a third time in the same conditions. For labeling, POS were resuspended in 10% sucrose, 20 mM sodium phosphate pH 7.2 and 5 mM taurine (or DMEM) and incubated with 1 mg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC) (Life Technologies) for 1.5 hours at room temperature while rotating. POS were washed twice in 10% sucrose, 20 mM

sodium phosphate pH 7.2 and 5 mM taurine and once in DMEM, and then resuspended, counted, aliquoted and frozen in DMEM containing 2.5% sucrose.

Cells were challenged with approximately 10 POS per RPE cell resuspended in straight DMEM. In some assays, recombinant MerTK ligand proteins at 10  $\mu\text{g/mL}$  were added to the POS suspension before challenging the cells for 3 hours at 37°C as previously described (Law et al, 2015). Cells were then washed three times with PBS-CM (0.2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  and 1 mM  $\text{Mg}^{2+}$ ) at the end of the incubation. An incubation of part of the wells in each condition with trypan blue for 10 min quenches the fluorescence of surface-bound FITC-labeled POS and allows us to quantify only POS internalization (Finnemann et al., 1997) and washed twice with PBS-CM. After a fixation step of 10 minutes with ice-cold methanol for all wells, nuclei were counterstained with DAPI. FITC-POS- and DAPI-labeled nuclei-derived signals were quantified using a microplate fluorescence reader (Infinite M1000, Magellan 6 software, Tecan).

### *Statistical analysis*

All experiments were repeated between 3 to 8 times. Obvious outliers were removed from the calculations on the basis of their highest difference to the calculated mean when including all samples. Significance of results was assessed using either the Student *t* test in one-to-one comparisons or non-parametric one-way ANOVA with a Tukey post-test when comparing multiples samples. In all cases, significances levels are depicted as follows: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  and \*\*\*  $P < 0.001$ .

**Acknowledgements**

The authors would like to thank Stéphane Fouquet (Imaging Facility – Institut de la Vision) for help with confocal microscopy and Marie-Laure Niepon (Histology Facility – Institut de la Vision) for help with tissue embedding.

This work was supported by a Project Prant from Sanofi-Fovea, by Fondation Voir et Entendre [Young Investigator Grant to EFN], by Agence Nationale de la Recherche [“Jeunes Chercheurs, Jeunes Chercheurs” Grant ANR-12-JSV1-0003 to EFN] and by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). Additionally, the Institut de la Vision is funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Sorbonne Universités UPMC-Paris 6, CNRS and Département de Paris.

**Author contributions**

EFN designed the study; EFN, CP, JC, QR and DN performed experiments and collected the data; EFN, CP, JC, QR and DN analyzed the data; EFN, CP and JC prepared the manuscript; QR and DL corrected the manuscript.

**Conflict of Interest**

The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Anderson HA, Maylock CA, Williams JA, Paweletz CP, Shu H, Shacter E (2003) Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Immunol* 4(1):87-91
2. Bok D, Hall MO (1971) The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 49(3): 664-82
3. Bulloj A, Duan W, Finnemann SC (2013) PI 3-kinase independent role for AKT in F-actin regulation during outer segment phagocytosis by RPE cells. *Exp Eye Res* 113:9-18
4. Burstyn-Cohen T, Heeb MJ, Lemke G (2009) Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J Clin Invest* 119(10):2942-53
5. Burstyn-Cohen T, Lew ED, Través PG, Burrola PG, Hash JC, Lemke G (2012) Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron* 76(6): 1123-32
6. Cheong HS, Lee SO, Choi CB, Sung YK, Shin HD, Bae SC (2007) MERTK polymorphisms associated with risk of haematological disorders among Korean SLE patients. *Rheumatology (Oxford)* 46(2): 209-14
7. Cummings CT, Deryckere D, Earp HS, Graham DK (2013) Molecular pathways: MERTK signaling in cancer. *Clin Cancer Res* 19(19): 5275-80
8. D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J, Matthes MT, Abderrahim H, LaVail MM, Vollrath D (2000) Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Mertk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 9(4): 645-51
9. Dickhout JG, Basseri S, Austin RC (2008) Macrophage function and its impact on atherosclerotic lesion composition, progression, and stability: the good, the bad, and the ugly. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(8): 1413-5
10. Dransfield I, Zagórska A, Lew ED, Michail K, Lemke G (2015) Mer receptor tyrosine kinase mediates both tethering and phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Death Dis* 6:e1646
11. Duncan JL, LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Yang H, Trautmann N, Chappelov AV, Feng W, Earp HS, Matsushima GK, Vollrath D (2003) An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(2): 826-38
12. Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD, Rodriguez-Boulan E (1997) Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alpha(v)beta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24):12932-7
13. Finnemann SC, Rodriguez-Boulan E (1999) Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins, and protein kinase C regulates alphavbeta5 binding and cytoskeletal linkage. *J Exp Med* 190:861-74

14. Finnemann SC (2003) Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J* 22(16):4143-54
15. Gal A, Li Y, Thompson DA, Weir J, Orth U, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Vollrath D (2000) Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 26(3): 270-1
16. Gallicchio M, Mitola S, Valdembri D, Fantozzi R, Varnum B, Avanzi GC, Bussolino F (2005) Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood* 105(5):1970-6
17. Hafizi S, Dahlbäck B (2006a) Signalling and functional diversity within the Axl subfamily of receptor tyrosine kinases. *Cytokine Growth Factor Rev* 17(4):295-304
18. Hafizi S, Dahlbäck B (2006b) Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J* 273(23): 5231-44
19. Hall MO, Obin MS, Prieto AL, Burgess BL, Abrams TA (2002) Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires gamma-carboxyglutamic acid (Gla) and Ca(2+) and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro. *Exp Eye Res* 75(4):391-400
20. Hall MO, Obin MS, Heeb MJ, Burgess BL, Abrams TA (2005) Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 81(5): 581-91
21. Hanayama R, Tanaka M, Miwa K, Shinohara A, Iwamatsu A, Nagata S (2002) Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417(6885): 182-7
22. Huang X, Griffiths M, Wu J, Farese Jr RV, Sheppard D (2000) Normal development, wound healing, and adenovirus susceptibility in beta5-deficient mice. *Mol Cell Biol* 20:755-9
23. Korshunov VA, Mohan AM, Georger MA, Berk BC (2006) Axl, a receptor tyrosine kinase, mediates flow-induced vascular remodeling. *Circ Res* 98(11):1446-52
24. LaVail MM (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194(4269): 1071-4
25. Law AL, Parinot C, Chatagnon J, Gravez B, Sahel JA, Bhattacharya SS, Nandrot EF (2015) Cleavage of Mer tyrosine kinase (MerTK) from the cell surface contributes to the regulation of retinal phagocytosis. *J Biol Chem* 290(8):4941-52
26. Lemke G (2013) Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(11):a009076
27. Lew ED, Oh J, Burrola PG, Lax I, Zagórska A, Través PG, Schlessinger J, Lemke G (2014) Differential TAM receptor-ligand-phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *Elife* 3
28. Liao D, Wang X, Li M, Lin PH, Yao Q, Chen C (2009) Human protein S inhibits the uptake of AcLDL and expression of SR-A through Mer receptor tyrosine kinase in human macrophages. *Blood* 113(1):165-74

29. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C (1993) The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 13(8): 4976-85
30. Mao Y, Finnemann SC (2012) Essential diurnal Rac1 activation during retinal phagocytosis requires  $\alpha\beta 5$  integrin but not tyrosine kinases focal adhesion kinase or Mer tyrosine kinase. *Mol Biol Cell* 23(6):1104-14
31. McHenry CL, Liu Y, Feng W, Nair AR, Feathers KL, Ding X, Gal A, Vollrath D, Sieving PA, Thompson DA (2004) MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(5): 1456-63
32. Nakano T, Ishimoto Y, Kishino J, Umeda M, Inoue K, Nagata K, Ohashi K, Mizuno K, Arita H (1997) Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem* 272(47):29411-4
33. Nandrot E, Dufour EM, Provost AC, Péquignot MO, Bonnel S, Gogat K, Marchant D, Rouillac C, Sépulchre de Condé B, Bihoreau MT, Shaver C, Dufier JL, Marsac C, Lathrop M, Menasche M, Abitbol MM (2000) Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol Dis* 7(6 Pt B): 586-99
34. Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, Finnemann SC (2004) Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin. *J Exp Med* 200(12): 1539-45
35. Nandrot EF, Anand M, Almeida D, Atabai K, Sheppard D, Finnemann SC (2007) Essential role for MFG-E8 as ligand for  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29): 12005-10
36. Nandrot EF, Silva KE, Scelfo C, Finnemann SC (2012) Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin. *Biol Cell* 104(6): 326-41
37. Parinot et al, 2014 Parinot C, Rieu Q, Chatagnon J, Finnemann SC, Nandrot EF (2014) Large-scale purification of porcine or bovine photoreceptor outer segments for phagocytosis assays on retinal pigment epithelial cells. *J Vis Exp* (94):e52100
38. Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, Burstyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, Lemke G (2006) TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol Cell Neurosci* 33(1): 96-108
39. Ruggiero L, Connor MP, Chen J, Langen R, Finnemann SC (2012) Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not *Itgb5*<sup>-/-</sup> or *Mfge8*<sup>-/-</sup> mouse retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(21): 8145-8

40. Sasaki et al, 2006 Sasaki T, Knyazev PG, Clout NJ, Cheburkin Y, Göhring W, Ullrich A, Timpl R, Hohenester E (2006) Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J* 25(1):80-7
41. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C (1990) Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature* 343(6254): 170-3
42. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, Earp HS, Matsushima GK (2001) Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411(6834): 207-11
43. Stitt TN, Conn G, Goret M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF, Masiakowski P, Ryan TE, Tobkes NJ, Chen DH, DiStefano PS, Long GL, Basilico C, Goldfarb MP, Lemke G, Glass DJ et al. (1995) The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 80(4):661-70
44. Strick DJ, Feng W, Vollrath D (2009) MerTK drives myosin II redistribution during retinal pigment epithelial phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50(5):2427-35
45. Suleiman L, Négrier C, Boukerche H (2013) Protein S: A multifunctional anticoagulant vitamin K-dependent protein at the crossroads of coagulation, inflammation, angiogenesis, and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 88(3):637-54
46. Tschernutter M, Jenkins SA, Waseem NH, Saihan Z, Holder GE, Bird AC, Bhattacharya SS, Ali RR, Webster AR (2006) Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the MerTK gene. *Br J Ophthalmol* 90(6): 718-23
47. Uehara H, Shacter E (2008) Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* 180(4):2522-30
48. Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ, Yanagihara D, Bennett L, Sylber M, Merewether LA, Tseng A, Escobar E, Liu ET, Yamane HK (1995) Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* 373(6515):623-6
49. Walker FJ (1980) Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J Biol Chem* 255(12):5521-4
50. Wu Y, Singh S, Georgescu MM, Birge RB (2005) A role for Mer tyrosine kinase in  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Cell Sci* 118(Pt 3): 539-53
51. Young RW, Bok D (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42(2):392-403
52. Zagórska A, Través PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G (2014) Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol* 15(10):920-8



**Table I**

Gene names, accession number and corresponding sequences of the oligonucleotides used for quantification of gene expression via qPCR.

| <b>Mouse gene</b><br>Accession #       | <b>Forward Primer</b> | <b>Reverse Primer</b> |
|--|-----------------------|-----------------------|
| <b><i>Rplp0</i></b><br>NM_007475.5     | CCTGAAGTGCTCGACATCAC  | TGCCAGGACGCGCTTGTAC   |
| <b><i>Gas6</i></b><br>NM_019521.2      | ATCAACCACGGCATGTGGC   | CGGTGAGATTCAGGTGATAG  |
| <b><i>Protein S</i></b><br>NM_011173.2 | GCAGGAGTTGTCTTATATCTG | CACGAAGCGCAATCAGGAG   |

**Table II**

List of mutants chosen on the minor and major ligand binding sites of MerTK extracellular domain and related amino acids changes.

| Site           | Amino Acid Change | Sequence Change    |
|----------------|-------------------|--------------------|
| <b>Minor</b>   | p.Leu196Gly       | c.571C>G, c.572T>G |
|                | p.Lys263Ile       | c.788A>T           |
|                | p.Lys269Leu       | c.805A>C, c.806A>T |
| <b>Major</b>   | p.Gly122Arg       | c.364G>C           |
|                | p.Thr145Ala       | c.418A>G           |
|                | p.Phe147Val       | c.424T>G           |
| <b>Control</b> | p.Pro120Arg       | c.341C>G           |

## **Figure legends**

### **Figure 1**

**The expression profile of Gas6 is quite stable along the light:dark cycle.** Analysis of the mRNA (A, C, E) and protein (B, D) expression profiles for Gas6 in RPE/choroid, retina or IPM for wildtype (A-E) and beta5 integrin knockout mice (E) at different times of day as indicated. The black bar under each graph represents the time-points during which lights are on in the animal facility. (A) qPCR experiments allowed us to show that *Gas6* expression is slightly increased at the time of and just after the phagocytic peak in retina and RPE/choroid, respectively. (B) Corresponding protein quantification of fellow eye lysates loaded on immunoblots follows the same profiles. (C) Interestingly, at all times expression of *Gas6* was higher in retinal tissues (black line) than in RPE/choroid (grey line). (D) Amounts of soluble Gas6 available in the IPM for MerTK receptors evaluated by immunoblots and ELISA confirm the same trend of expression. A representative immunoblot illustrate the slight variability of Gas6 expression along the day and night. (E) Beta5 integrin knockout mice devoid of the daily rhythm of POS phagocytosis ( $\beta 5^{-/-}$ , grey lines) show no difference in their expression profile of Gas6 when compared to control wildtype mice (black lines). All quantifications are expressed in arbitrary units (a.u.) –except for ELISA expressed in ng/mL– as mean  $\pm$  SD,  $n = 3-6$  independent samples. The reference set as 1 for comparison is the quantification at 8.00 AM (light onset) for each single graph. In case of 2 graphs, the reference chosen is the measure at the same time for the RPE/choroid (C) or the wildtype sample (E).

### **Figure 2**

**Peaks of Protein S expression exist in both RPE/choroid and retina and correlate with the daily rhythm of phagocytosis.** Analysis of the mRNA (A, C, E, F) and protein (B, D) expression profiles for Protein S (Pros1) in RPE/choroid, retina or IPM for wildtype (A-F) and beta5 integrin knockout mice (E, F) at different times of day as indicated. The black bar under each graph represents the time-points during which lights are on in the animal facility. (A) *Protein S* expression increases just before and at the time of phagocytosis in RPE/choroid and retina, respectively. In both tissue samples a second peak occurs at night offset (retina) of just after (RPE/choroid). (B) Protein quantification on immunoblots of fellow eye RPE/choroid follows the same profile as in (A) but with a 3-hour delay. (C) As observed for *Gas6*, *Protein S* transcription was higher in retinal tissues (black line) than in RPE/choroid (grey line) at all times. (D) Representative immunoblot and corresponding quantification of soluble ligands detected in the IPM shows a sharp increase in the amounts of Protein S

available in the IPM for MerTK receptors. (E) In contrast to *Gas6*, some peaks of *Protein S* expression just before or at phagocytosis time are lost in  $\beta 5^{-/-}$  mice (grey lines) when compared to control wildtype mice (black lines). (F) Interestingly, in the absence of the phagocytic rhythm in these animals (grey line) the cyclic expression of *MerTK* present in control mice (black line) is lost as well. [F: modified from Law et al, *The Journal of Biological Chemistry* 2015]. All quantifications are expressed in arbitrary units (a.u.) as mean  $\pm$  SD,  $n = 3-7$  independent samples. The reference set as 1 for comparison is the quantification at 8.00 AM (light onset) for each single graph. In case of 2 graphs, the reference chosen is the measure at the same time for the RPE/choroid (C) or the wildtype sample (E, F).

### Figure 3

**Gas6 is more expressed than Protein S in the retina and is more sensitive to siRNA inhibition.** (A) *Gas6* and *Protein S* (*Pros1*) mRNA expression profiles in RPE/choroid and retina of wildtype mice were compared at different times of day as indicated. The black bar under each graph represents the time-points during which lights are on in the animal facility. In both tissue samples *Gas6* (grey lines) is much more transcribed than *Protein S* (black lines) as measured by qPCR using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Expressed in arbitrary units (a.u.) as mean  $\pm$  SD,  $n = 3-7$  independent samples. The reference set as 1 for comparison is the quantification at 8.00 AM (light onset) for the wildtype sample. (B) Respective ligand localization in the retina at 10.00 AM was evaluated on tissue sections by immunofluorescence. *Gas6* (green, left panel) is expressed in photoreceptor inner (PIS) and outer segments (POS), as well as in RPE cells. *Protein S* (green, right panel) is also expressed by photoreceptors and RPE cells, and is enriched in the POS area. Nuclei labeled with DAPI appear in magenta. (C, D) siRNA were used to downregulate the endogenous production of each ligand by RPE-J cells. Cells were then subjected to phagocytosis assays for 1.5 (C) and 3 hours (D) without the addition of ligands. Decrease in *Gas6* synthesis (blue bars) leads to diminished binding and internalization of POS compared to control siRNA (grey bars) as indicated. Blocking the production of *Protein S* (green bars) only slightly affects binding at 1.5 hours. Targeting of both ligands production (purple bars) has the same effect as decrease of *Gas6* alone. Expressed in arbitrary units (a.u.) as mean  $\pm$  SD,  $n = 5-6$  independent experiments, \*  $P < 0.01$ . Reference set as 1 is the total phagocytosis –binding + internalization–for the control condition.

**Figure 4****Gas6 and Protein S bind to MerTK on different amino acids of the major binding site.**

(A) Mutants targeting the minor (purple bars) and the major (blue bars) binding sites of MerTK were transfected in RPE-J and tested for their influence on binding and internalization of POS when compared to non-mutated *MerTK* (black bar) or to the non-deleterious p.Pro120Arg mutant (P120A, grey bars) as indicated. In the major site, the p.Thr145Ala (T145A) mutant increases both phagocytosis steps while p.Phe147Val (F147V) slightly decreases binding. Regarding the minor site, the p.Lys269Leu (K269L) decreases phagocytosis while p.Lys263Ile (K263I) has no effect. (B) To further investigate the major site mutants, during the phagocytosis assays we added Gas6 and Protein S (Prot S) ligands, either alone or in combination, as indicated. The p.Gly122Arg (G122R, light blue bars) mutant seems to accelerate phagocytosis in the presence of Protein S as less binding and more internalization (see arrows) is observed compared to control (black bars). This effect is reinforced in the presence of Gas6 (Gas6 + Prot S condition). The other 2 mutants, p.Thr145Ala and p.Phe147Val, only impact internalization in the presence of Gas6 (see arrows). Effect of Gas6 is lessened in the presence of Protein S for p.Thr145Ala (Gas6 + Prot S condition). Expressed in arbitrary units (a.u.) as mean  $\pm$  SD,  $n = 4-5$  (A) or  $n = 3-4$  (B) independent experiments. Reference set as 1 is the total phagocytosis –binding + internalization–for the control condition.

Figure 1

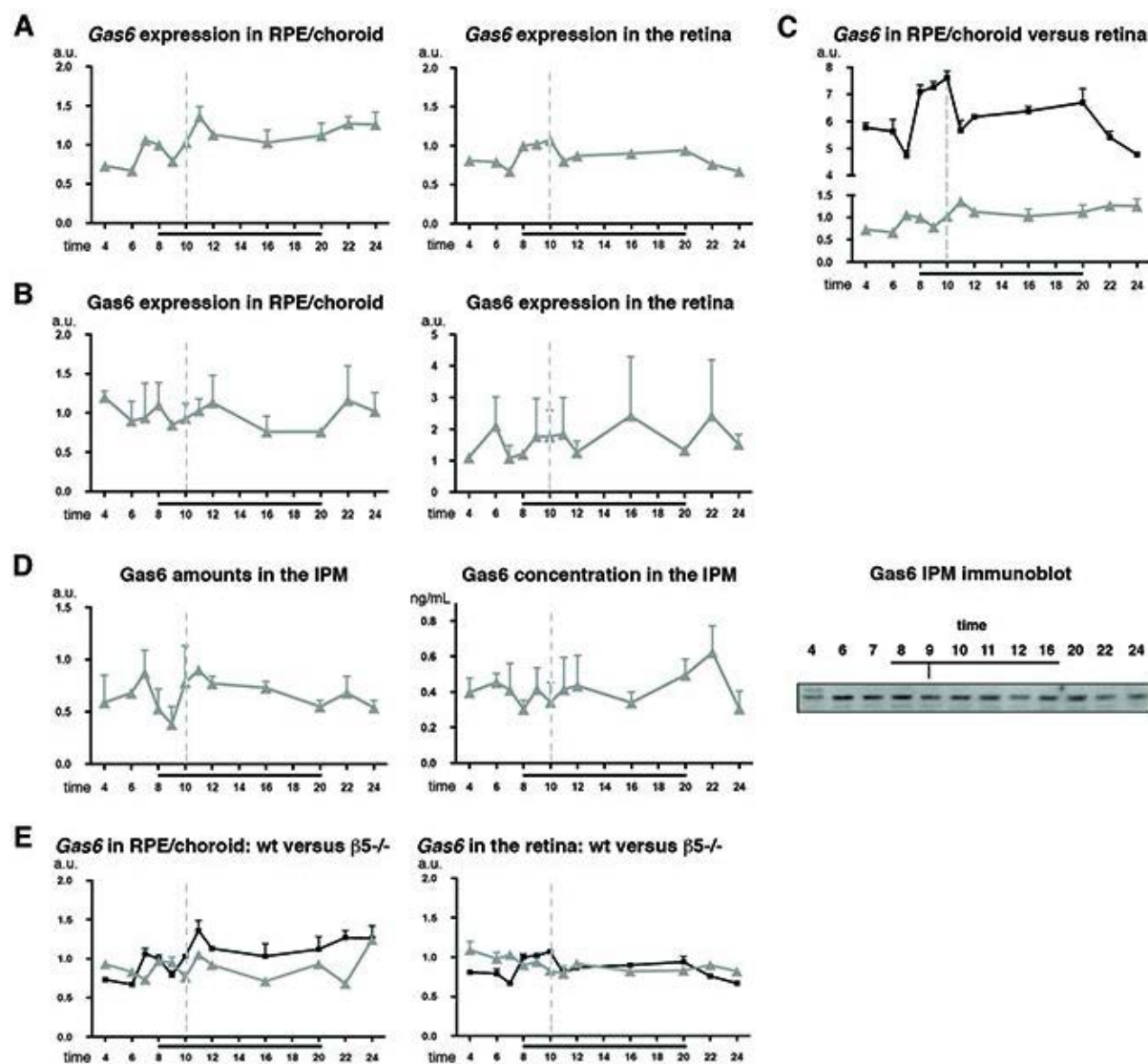


Figure 2

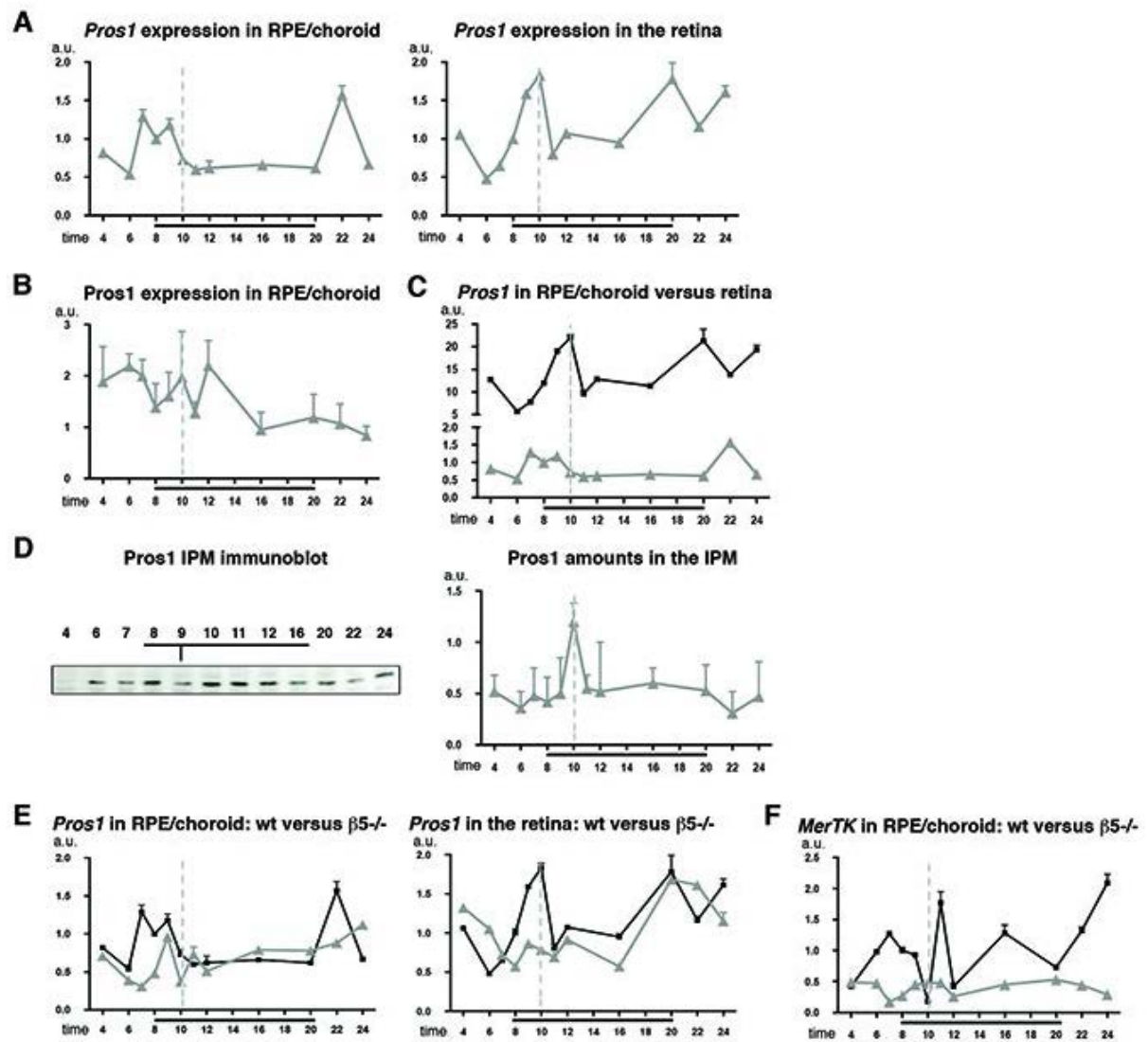


Figure 3

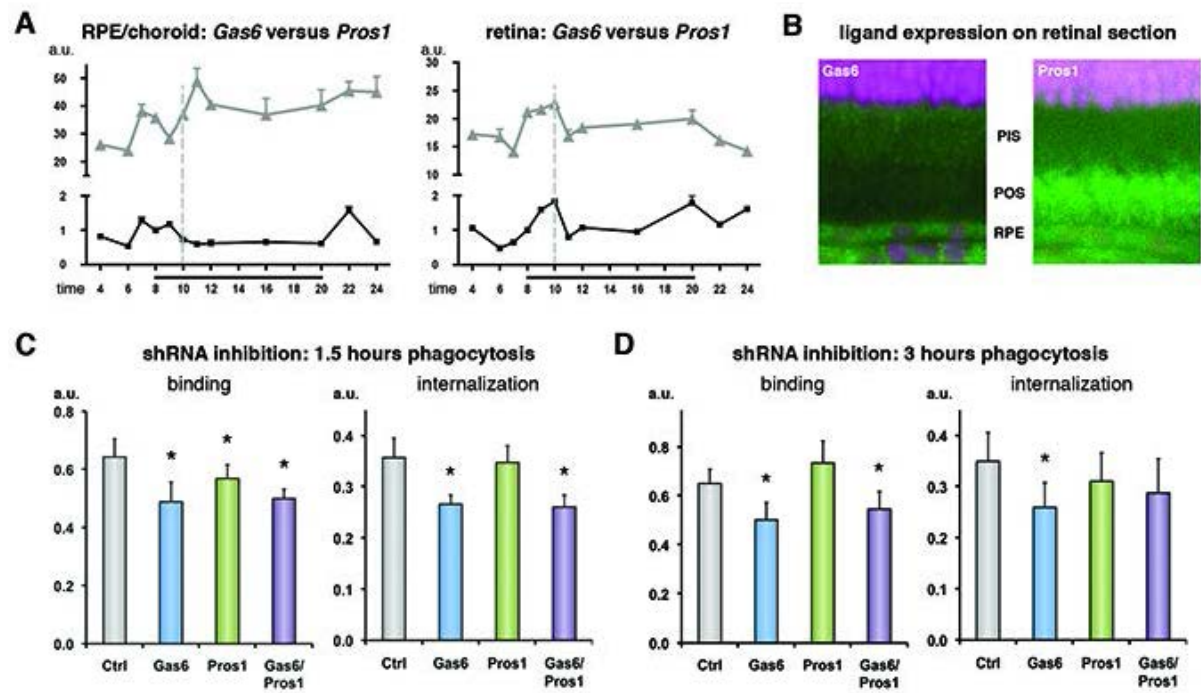
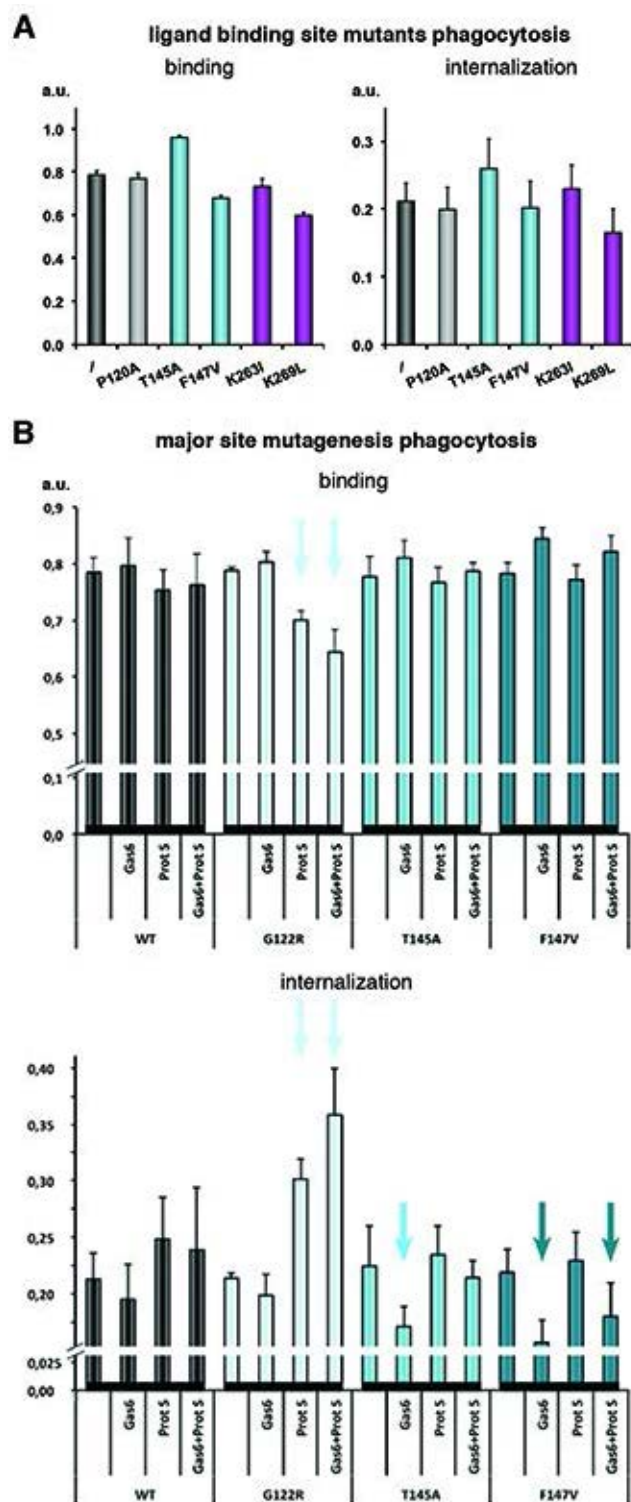




Figure 4



### 3. Discussion

Précédemment nous avons montré que Gas6 et Protéine S présentent un rôle opposé sur la régulation de la fonction de MerTK (Law et al., 2015). Les données obtenues dans cette étude renforcent ces résultats. En effet, *in vivo*, dans la MIP la quantité de Gas6 est stable durant le cycle jour–nuit, et *in vitro* nous avons montré que Gas6 inhibe la phagocytose des SEP et stimule le clivage de MerTK. La quantité de Protéine S dans la MIP est constante et faible tout au long du rythme circadien excepté, au moment du pic de phagocytose où Protéine S est présente en grande quantité. *In vitro*, elle stimule la phagocytose des SEP et inhibe le clivage de MerTK. Ainsi, nous pensons que Gas6 a un rôle inhibiteur constant, et qu’au moment du pic de phagocytose, la nette augmentation de Protéine S dans la MIP pourrait permettre une activation complète du récepteur MerTK induisant l’internalisation des SEP. MerTK possède une faible affinité pour Gas6, et il est possible que l’affinité pour Protéine S soit plus importante. Ainsi, la synthèse de Protéine S pourrait changer la stoechiométrie entre les deux ligands pour augmenter l’activabilité du récepteur et potentialiser le pic de phagocytose. De plus, il semble que Gas6 et Protéine S se fixent sur des acides aminés différents au niveau des sites de liaison de MerTK, ce qui pourrait engendrer une compétition entre eux pour le récepteur et/ou induire un changement de conformation de MerTK lors de la fixation d’un ligand.

### III. Identification de la protéase responsable du clivage de MerTK

#### 1. Introduction : choix des candidats

Nous avons montré que les cellules d'EPR en culture produisent du sMerTK suite au clivage de l'ectodomaine de MerTK. De plus, dans la rétine ce clivage s'effectue selon un rythme circadien libérant le sMerTK dans la MIP. Cependant, la protéase responsable de ce clivage est toujours inconnue. En 2011, Thorp et ses collègues ont montré que MerTK est clivé par ADAM17 chez les macrophages (Thorp et al., 2011). Nous avons décidé d'étudier cette protéase dans la rétine afin de savoir si elle est également responsable du clivage de MerTK dans ce tissu. En analysant le rôle des ligands, Gas6 et Protéine S, sur l'activité de MerTK *in vitro*, nous avons constaté que, au contraire des macrophages, ils présentent un rôle opposé. De plus, ils paraissent lier MerTK au niveau d'acides aminés différents et *in vivo*, leur profil d'expression dans la MIP n'est pas similaire. Ainsi, il semble que la régulation de l'activité de MerTK soit régie de manière tissu-spécifique. Nous avons également montré qu'*in vitro* le clivage de MerTK est diminué en présence de TAPI-0. TAPI-0 est un inhibiteur non spécifique de protéases capable de bloquer la fonction d'ADAM9 et 17, de collagénases, de méprines et des MMP-1, 3, 9 et 13. Nous avons donc décidé d'inclure dans notre étude d'autres protéases qui pourraient être impliquées dans ce clivage.

ADAM17 appartient à la famille des métalloprotéases ADAM (voir Introduction Chapitre V). Nous avons rapporté le fait que plusieurs ADAM peuvent être responsables du clivage d'un même substrat. Ainsi ADAM9, 10 et 17 peuvent cliver les mêmes protéines. La protéase responsable du clivage peut également dépendre du type et de la stimulation cellulaires. Il a été montré qu'ADAM10 est responsable du clivage d'Axl, récepteur appartenant à la même famille que MerTK, et que les souris déficientes pour *ADAM9* développent une dégénérescence rétinienne, avec la présence de vésicules dans l'EPR et une perte de contact entre les SEP et l'EPR (Budagian et al., 2005; Parry et al., 2009). Des mutations sur le gène *ADAM9* ont également été identifiées chez des patients atteints de dystrophies rétinienne (El-Haig et al., 2014; Goldstein et al., 2010; Hull et al., 2015). Nous avons donc décidé d'étudier le potentiel rôle d'ADAM9, 10 et 17 dans le clivage de MerTK au niveau de la rétine.

En 2006, un polymorphisme dans le promoteur du gène *HTRA1* (high-temperature requirement factor A1) a été identifié comme conférant un risque majeur pour le développement de la DMLA (DeWan et al., 2006; Yang et al., 2006). HtrA1 est une sérine

protéase sécrétée impliquée dans l'homéostasie et le renouvellement de la matrice extracellulaire en dégradant les protéines comme la fibronectine et l'aggrécane. Elle est exprimée et sécrétée par l'EPR. Sa surexpression dans l'EPR provoque une néovascularisation de la choroïde en augmentant la sécrétion de VEGF par l'EPR et un remodelage de la membrane de Bruch (Jones et al., 2011; Vierkotten et al., 2011). Nous avons donc décidé de l'inclure dans notre étude pour tester son implication dans le clivage de MerTK dans la rétine. A ce jour aucune étude n'a analysé le rôle d'HtrA1 dans la phagocytose des SEP par l'EPR.

Dans le but de discriminer les différentes protéases candidates, nous avons étudié leur expression dans la rétine *in vivo* à différentes heures de la journée. Nous nous sommes également intéressés à leur localisation sur des coupes de rétine. *In vitro*, nous avons voulu savoir si les candidats sont localisés au même endroit que MerTK dans les cellules RPE-J au cours de la phagocytose. Nous avons également réalisé des expériences de digestion *in vitro* entre protéines recombinantes dans différentes conditions. Enfin, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques d'ADAM10 ou d'ADAM10 et 17. Nous avons analysé leurs effets sur la capacité phagocytaire des cellules, l'activation de MerTK et son clivage, et enfin la disponibilité en récepteurs complets à la surface des cellules.

## 2. Matériels et méthodes

### **Réactifs et anticorps**

Les protéines recombinantes de souris MerTK, Gas6, MFG-E8, ADAM9, ADAM10 et ADAM17 proviennent de chez R & D Systems. La protéine recombinante de souris Protéine S provient de chez MP Biomedicals. La protéine recombinante humaine HtrA1 provient de chez Thermo Scientific. Les inhibiteurs GW280264X et GI254023X sont synthétiques et proviennent de chez Glix Laboratories.

Les anticorps utilisés pour les immunoblots (IB) et les marquages immunofluorescents (IF) sont : actine (souris, Abcam ab3280, IB), ADAM9 (lapin, Cell Signaling 2099, IB, IF), ADAM10 (lapin, Abcam ab84595, IB), ADAM10 (lapin, eBioscience 14-6211, IF), ADAM17 (lapin, Abcam ab2051, IB, IF), HtrA1 (lapin, Abcam ab65903, IF), HtrA1 (lapin, Millipore AB15852, IB), phospho-MerTK (lapin, Fabgennix PMKT-140AP, IB), et ZO-1 (rat, eBioscience 14-9776, IF).

### ***Quantification de l'expression des gènes des protéases***

Les ARN ont été obtenus à partir d'yeux de souris dans les mêmes conditions que précédemment (Law et al., 2015) (Partie 1 des Résultats). Les qPCR, et leur analyse ont également été réalisées dans les mêmes conditions. Voici la liste des amorces utilisées pour les différentes protéases :

| <b>Nom du gène</b> | <b>Amorce 5'</b>       | <b>Amorce 3'</b>       |
|--------------------|------------------------|------------------------|
| <i>HTRA1</i>       | TTGCGCTTATCAAGATTGACC  | TGGTGCTGACGATCCCAGT    |
| <i>ADAM9</i>       | ATGTGGAGCTGTTTCATTGTTG | AGTCCAACCAGCACAATTCG   |
| <i>ADAM10</i>      | GGAAGTACCAAATGACTGGAG  | AGGTGATCTGTCTGGATATAGA |
| <i>ADAM17</i>      | ATCTACAGTCTGCGACACAC   | CGCTGTACTCGCTTTCTTCT   |

### ***Culture cellulaire***

La lignée cellulaire de rat RPE-J est maintenue à 32°C et 5% de CO<sub>2</sub> comme décrit précédemment (Law et al., 2015) (Partie 1 des Résultats).

### ***Purification des segments externes des photorécepteurs***

Nous avons récemment publié un article paru dans le *Journal of Visualized Experiments* en décembre 2014 qui explique la méthode utilisée pour isoler les SEP à partir d'yeux de porc (Parinot et al., 2014) (Annexe 2). Cet article s'accompagne d'une vidéo expliquant les étapes cruciales de cette expérience.

Brièvement, dans le noir sous lampe rouge, le globe oculaire est séparé en une partie antérieure et une partie postérieure. Sur la partie postérieure, les rétines sont collectées dans un tampon d'homogénéisation (20% sucrose, 20 mM Tris acétate pH 7.2, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose, 5 mM taurine). Après la collection, la suspension de rétines est secouée vigoureusement, pour séparer les différentes couches de cellules et casser le cil connecteur des photorécepteurs, puis filtrée trois fois à travers de la gaze pour enlever les fragments de tissus les plus épais. Cette suspension est ensuite chargée sur des gradients continus de sucrose de 25% à 60% (tampon : 20 mM Tris acétate pH 7.2, 10 mM glucose et 5 mM taurine) et ultracentrifugée à 25 000 rpm pendant 50 minutes à 4°C (Beckman rotor SW-32-Ti). Les bandes oranges correspondantes aux SEP sont collectées et diluées dans 4-5 volumes de tampon contenant 20 mM Tris acétate pH 7.2 et 5 mM taurine, suivie par une centrifugation à 5 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C (Beckman rotor JA25.50). Les culots sont lavés dans du tampon contenant 10% de sucrose, 20 mM Tris acétate pH 7.2 et 5 mM

taurine et centrifugés à 5 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C avant d'être resuspendus dans 10% de sucrose, 20 mM sodium phosphate pH 7.2 et 5 mM taurine pour être de nouveau centrifugés (mêmes conditions). Les SEP purifiés sont resuspendus, comptés, aliquotés et conservés à -80°C dans du DMEM contenant 2,5% de sucrose.

Pour obtenir des SEP marqués au FITC (fluorescein isothiocyanate) les SEP sont resuspendus dans 10% de sucrose, 20 mM Tris acétate pH 7.2 et 5 mM taurine et incubés avec 1 mg/mL de FITC pendant 1 heure 30 minutes à température ambiante sous rotation en les protégeant de la lumière. Les SEP marqués sont ensuite lavés et stockés comme décrit ci-dessus.

### ***Phagocytose avec les SEP***

Les cellules sont incubées pendant 3 heures avec des SEP marqués ou non, environ 10 SEP par cellule d'EPR, après qu'ils aient été resuspendus dans du DMEM. Les expériences ont été réalisées dans les conditions décrites précédemment (Law et al., 2015) (Partie 1 des Résultats).

### ***Lyse des échantillons et immunoblots***

L'isolation des protéines solubles et l'extraction des protéines, provenant des yeux de souris et de lignées cellulaires, et les immunoblots de ces protéines ont été réalisés dans les mêmes conditions que précédemment (Law et al., 2015) (Partie 1 des Résultats).

### ***Immunofluorescence***

Pour réaliser les IF sur coupes de rétine, les globes oculaires retirés délicatement de l'animal sont fixés durant 1 heure, la cornée est ensuite ouverte les globes sont de nouveau fixés 3 heures avec un fixateur de Davidson (tampon : 3/9<sup>ème</sup> d'éthanol à 95%, 1/9<sup>ème</sup> d'acide acétique glacial, 2/9<sup>ème</sup> de solution de formaldéhyde à 37% et 3/9<sup>ème</sup> d'eau distillé). Le cristallin est disséqué du globe oculaire qui est de nouveau fixé pendant 2 heures. Le globe oculaire est ensuite déshydraté par bains successifs d'éthanol et de substitut de xylène (Ottix Plus - Diapath) puis inclus dans de la paraffine. Les échantillons sont coupés à 8 µm d'épaisseur à l'aide du microtome Microm HM 330 et déposés sur lame Superfrost Plus. Les coupes sont ensuite déparaffinées avec de l'Ottix Plus (Diapath) et réhydratées. Les coupes sont incubées dans un tampon SSC 1X (standard saline citrate) contenant 5% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de la formamide déionisée pendant 10 minutes sous lampe afin d'éliminer les pigments de mélanine. Les sites non spécifiques des coupes sont bloqués avec une solution de BSA 10%

(bovine serum albumine) en TBS 1X (tris buffered solution) pendant 30 minutes, puis incubées avec les anticorps primaires sur la nuit. Les coupes sont lavées en TBS 1X + 10% de BSA pour éliminer les excédents d'anticorps primaires puis incubées avec les anticorps secondaires et relavées. Les noyaux des cellules sont marqués au DAPI et les lames sont montées avec du milieu Vectashield (Vector Laboratories). Les images fluorescentes ont été acquises avec un microscope à épifluorescence Leica DM6000b. Les images ont été compilées avec Image J (version 2.0.0-rc-29/1.49s) puis traitées avec Adobe Photoshop CS6.

Pour les tests de phagocytose, les cellules sont incubées avec des SEP non marqués pendant 3 heures puis lavées, marquées pour les protéines d'intérêt et fixées comme décrit précédemment (Law et al., 2015) (Partie 1 des Résultats).

### ***Digestion de protéines recombinantes in vitro***

Pour savoir si les protéases recombinantes sont capables de cliver MerTK *in vitro*, 10 ng/ $\mu$ L de protéines recombinantes MerTK de souris sont pré-incubées pendant 2 heures à 600 rpm à température ambiante, avec les protéines recombinantes Gas6, Protéine et MGF-E8 seules ou combinées à la concentration de 0,5 ng/ $\mu$ L. Le mélange est ensuite incubé pendant 3 heures à 37°C, en présence des protéases recombinantes ADAM9, 10, 17 à la concentration de 20 ng/ $\mu$ L ou HtrA1 à la concentration de 5 ng/ $\mu$ L. 1/5<sup>ème</sup> de chaque réaction a été analysé sur immunoblots.

### ***Blocage de la fonction d'ADAM10 et d'ADAM17***

Pour tester l'effet du blocage d'ADAM10 (par GI254023X) et d'ADAM10 et 17 (par GW280264X) sur MerTK et la phagocytose, les cellules RPE-J sont lavées avec du DMEM et pré-incubées pendant 1h30 avec un des inhibiteurs ou seulement du milieu. Les cellules sont ensuite incubées avec les SEP marqués (test de phagocytose) ou non (IF) en présence des différentes doses de GW et GI. Les doses utilisées sont 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M pour GW et 4,6  $\mu$ M, 23  $\mu$ M et 46  $\mu$ M pour GI. Les doses de GI utilisées permettent d'obtenir la même efficacité d'inhibition d'ADAM10 que pour GW. Elles ont été calculées sur la base de leurs IC<sub>50</sub> respectives. L'IC<sub>50</sub> de GW pour ADAM10 est de 11,5 nM, et l'IC<sub>50</sub> de GI pour ADAM10 est de 5,3 nM. Le ratio entre les deux IC<sub>50</sub> est de :  $11,5 / 5,3 = 2,17$ . Les doses de GW à utiliser ont été fixées puis celles de GI ont été calculées en fonction : dose GW / 2,17 = dose GI. Ainsi nous pouvons en déduire uniquement l'effet de l'inhibition d'ADAM17 en calculant le ratio entre les effets observés avec les deux inhibiteurs (GW/GI). Dans la première série d'expériences, les milieux conditionnés des cellules ont été récupérés,

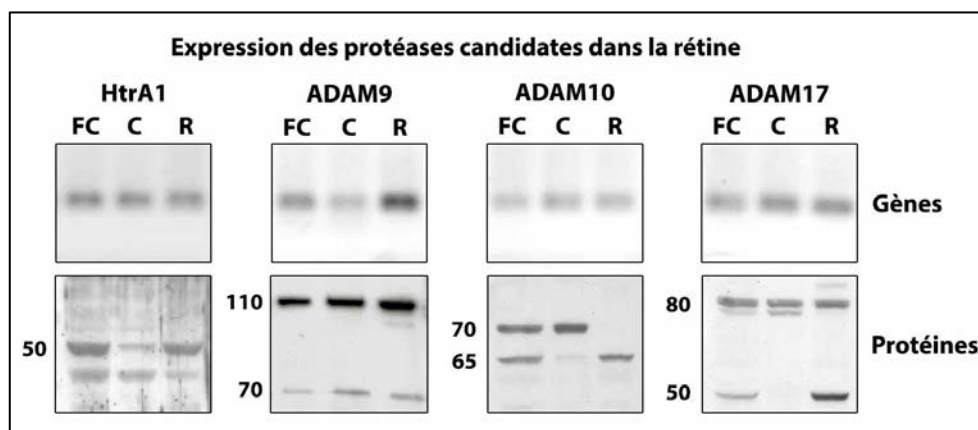
concentrés et déposés sur des gels SDS-PAGE (Law et al., 2015) (Partie 1 des Résultats). Les lysats cellulaires ont également été collectés et déposés sur gels. Dans la deuxième série d'expériences un test de phagocytose est effectué, et l'intensité de fluorescence des SEP marqués au FITC est quantifiée par un scanner de plaques et les données sont analysées comme décrit précédemment (Law et al., 2015) (Partie 1 des Résultats). Dans une troisième série d'expériences, après la phagocytose les protéines d'intérêt sont marquées pour immunofluorescence afin de pouvoir les observer au microscope confocal (Law et al., 2015) (Partie 1 des Résultats).

### 3. Résultats

#### a) L'expression de ces protéases varie au cours de la journée

Nous avons d'abord vérifié que nos candidats pour le clivage de MerTK sont exprimés dans l'œil. Nous avons quantifié le taux d'expression de leur gène par RT-PCR et de leur protéine par immunoblot soit dans le globe oculaire complet, soit uniquement dans la rétine, soit dans la partie la plus externe EPR/choroïde. Tous les gènes des candidats sont bien transcrits dans la rétine et l'EPR/choroïde (Figure 15). Les protéines sont également présentes dans ces deux tissus (Figure 15). L'immunoblot d'ADAM9 montre deux bandes : celle à 110 kD correspond à la proforme et celle à 70 kD à la forme mature. L'immunoblot d'ADAM10 montre également deux bandes : la forme entière migre à 70 kD tandis que la forme soluble, provenant du clivage d'ADAM10, se situe à 65 kD. Pour ADAM17, la bande à 80 kD représente la forme mature et la bande à 50 kD est une bande non identifiée qui pourrait correspondre à une forme soluble provenant du clivage de la forme mature.



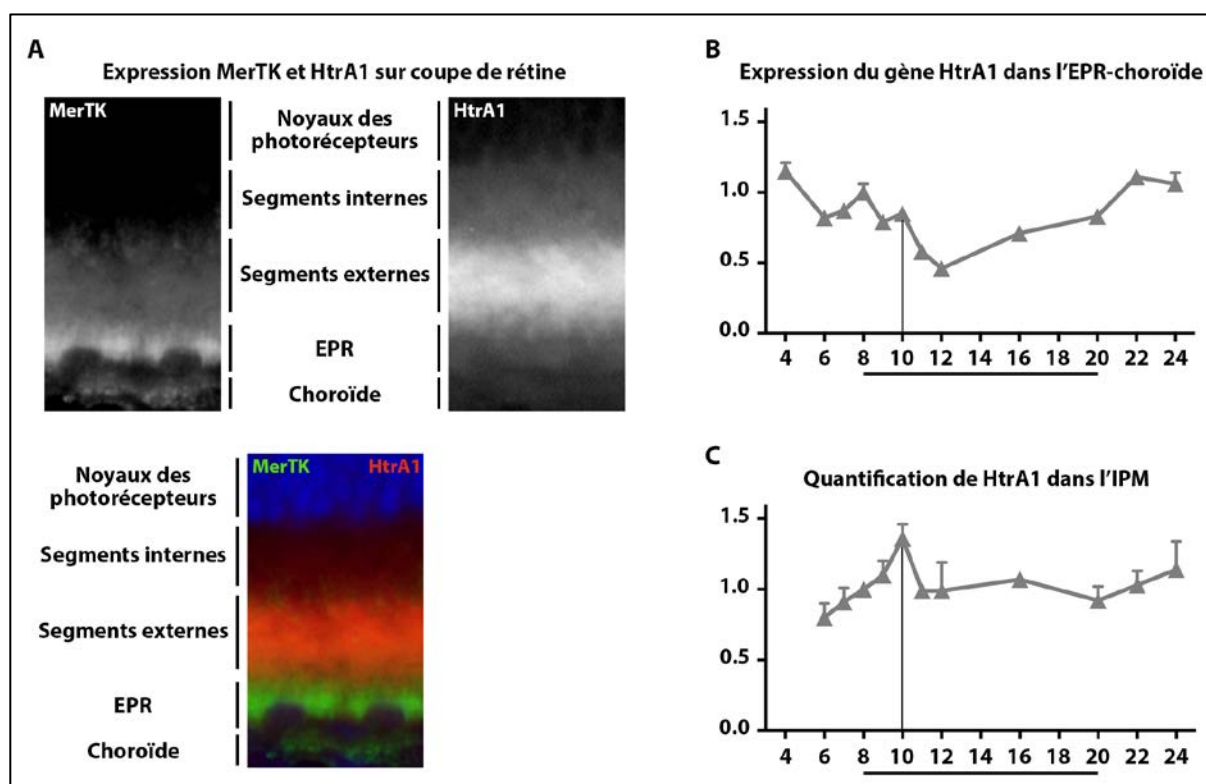


**Figure 15 : Les protéases HtrA1, ADAM9, 10 et 17 sont exprimées par la rétine et l'EPR.**

Le cristallin et la partie antérieure des yeux de souris ont été retirés du globe oculaire. La partie postérieure restante est soit conservée telle quelle, nommée ici FC (full cup), soit la rétine (R) est séparée de l'EPR/choroïde (C pour cup). Résultats de la PCR effectuée pour chaque protéase. L'ensemble des gènes des protéases testées est exprimé par la rétine et par l'EPR/choroïde (panneaux du haut). Les immunoblots correspondants montrent des tailles diverses en kDa pour ces protéases dans chacun de ces tissus, représentant les différentes formes des ADAM (panneaux du bas).

Comme nous l'avons montré précédemment, le clivage de MerTK suit un rythme circadien, avec une diminution juste avant le pic de phagocytose suivie d'une légère augmentation au moment de ce pic. Il serait donc intéressant de savoir si certaines protéases présentent un rythme circadien dans l'expression de leur gène et/ou dans leur expression protéique. Nous avons donc analysé l'expression de chaque candidat à 11 différentes heures de la journée dans l'EPR/choroïde et/ou dans la MIP. Afin d'affiner leur localisation protéique dans la rétine, nous avons réalisé des marquages immunofluorescents sur des coupes de rétine provenant d'animaux sacrifiés au moment du pic de phagocytose.

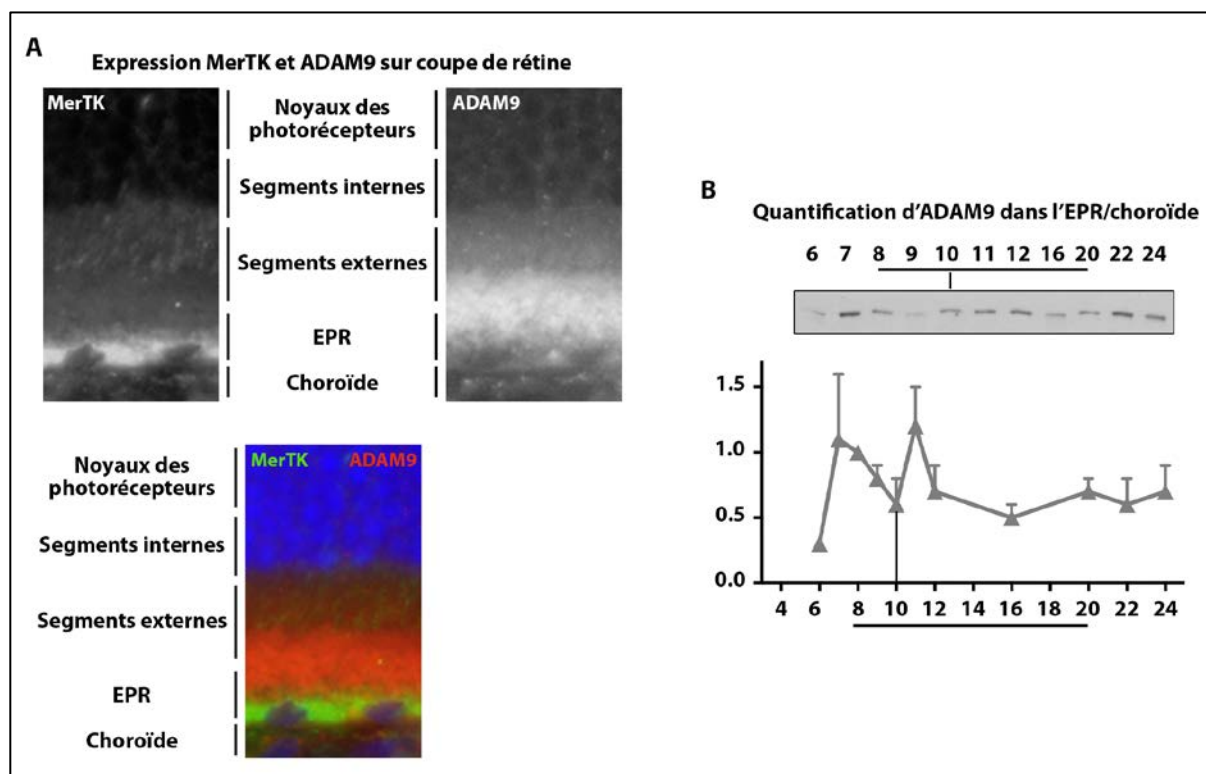
Sur les coupes de rétine, HtrA1 est bien présente dans la zone des segments externes des photorécepteurs où se situe la MIP (marquage diffus) (Figure 16, A). Elle ne semble toutefois pas colocaliser avec MerTK qui est exprimé dans les microvilli apicaux de l'EPR. L'expression du gène HtrA1 varie au cours du cycle jour-nuit. Son expression augmente au moment de l'arrivée de la lumière (8 heures), puis elle diminue jusqu'à 12 heures pour réaugmenter jusqu'à 22 heures (2 heures après l'extinction de la lumière) (Figure 16, B). HtrA1 est une protéine sécrétée, nous avons donc quantifié sur immunoblots la quantité de protéines se trouvant dans la MIP. La quantité de HtrA1 dans la MIP augmente jusqu'au moment du pic de phagocytose (10 heures), et est maximale à cette heure. Sa quantité diminue ensuite pour rester stable jusqu'à minuit (Figure 16, C).



**Figure 16 : Analyse de l'expression de HtrA1 dans la rétine de souris.**

(A) Marquage immunofluorescent de MerTK (blanc, en haut à gauche ; vert, en bas) et de HtrA1 (blanc, en haut à droite ; rouge, en bas) sur des coupes de rétine de souris incluses en paraffine. HtrA1 est localisée dans la zone des segments externes des photorécepteurs incluant la MIP, tandis que MerTK est localisé dans l'EPR. Analyse de l'expression du gène *HtrA1* (B) dans l'EPR/choroïde par qPCR et de la protéine HtrA1 (C) sécrétée dans la MIP. Les animaux sont maintenus dans un rythme 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. La présence de la lumière est représentée par la barre horizontale (8 heures - 20 heures). L'heure du pic de phagocytose est représentée par une barre verticale (10 heures) et 8 heures est choisi comme référence égale à 1. Moyenne  $\pm$  écart-type en unités arbitraires,  $N=3-5$  pour (B) et  $N=2-3$  pour (C).

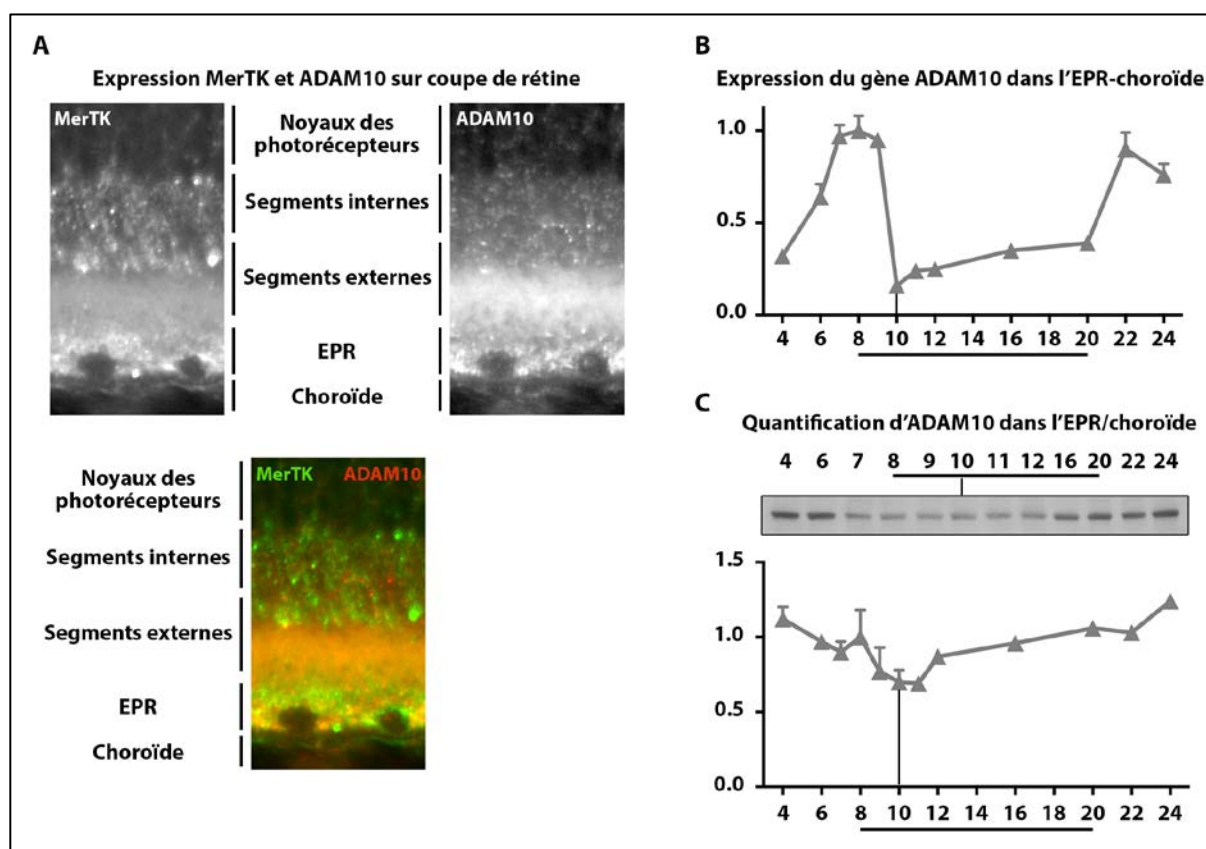
La protéine ADAM9 est présente dans la zone des segments externes des photorécepteurs où se trouvent les longs microvilli de l'EPR, et ne semble pas colocaliser avec MerTK (Figure 17, A). L'analyse de l'expression protéique d'ADAM9 dans l'EPR montre une variation au cours de la journée (Figure 17, B). Une augmentation de son expression est observée juste avant l'arrivée de la lumière et 1 heure après le pic de phagocytose. Cependant nous devons compléter les analyses d'ADAM9 dans la rétine pour affiner au mieux son profil d'expression protéique. Nous n'avons pas encore analysé le profil d'expression du gène ADAM9.



**Figure 17 : Analyse de l'expression d'ADAM9 dans la rétine de souris.**

(A) Marquage immunofluorescent de MerTK (blanc, en haut à gauche ; vert, en bas) et d'ADAM9 (blanc, en haut à droite ; rouge, en bas) sur des coupes de rétine de souris incluses en paraffine. ADAM9 est localisée dans la zone des segments externes des photorécepteurs, de la MIP et des longs microvilli de l'EPR, tandis que MerTK est localisé dans l'EPR. (B) Immunoblot d'ADAM9 au cours du cycle jour-nuit et analyse correspondante de son expression dans l'EPR/choroïde de souris.  $N = 2-3$  (Voir la figure 16 pour une légende complète).

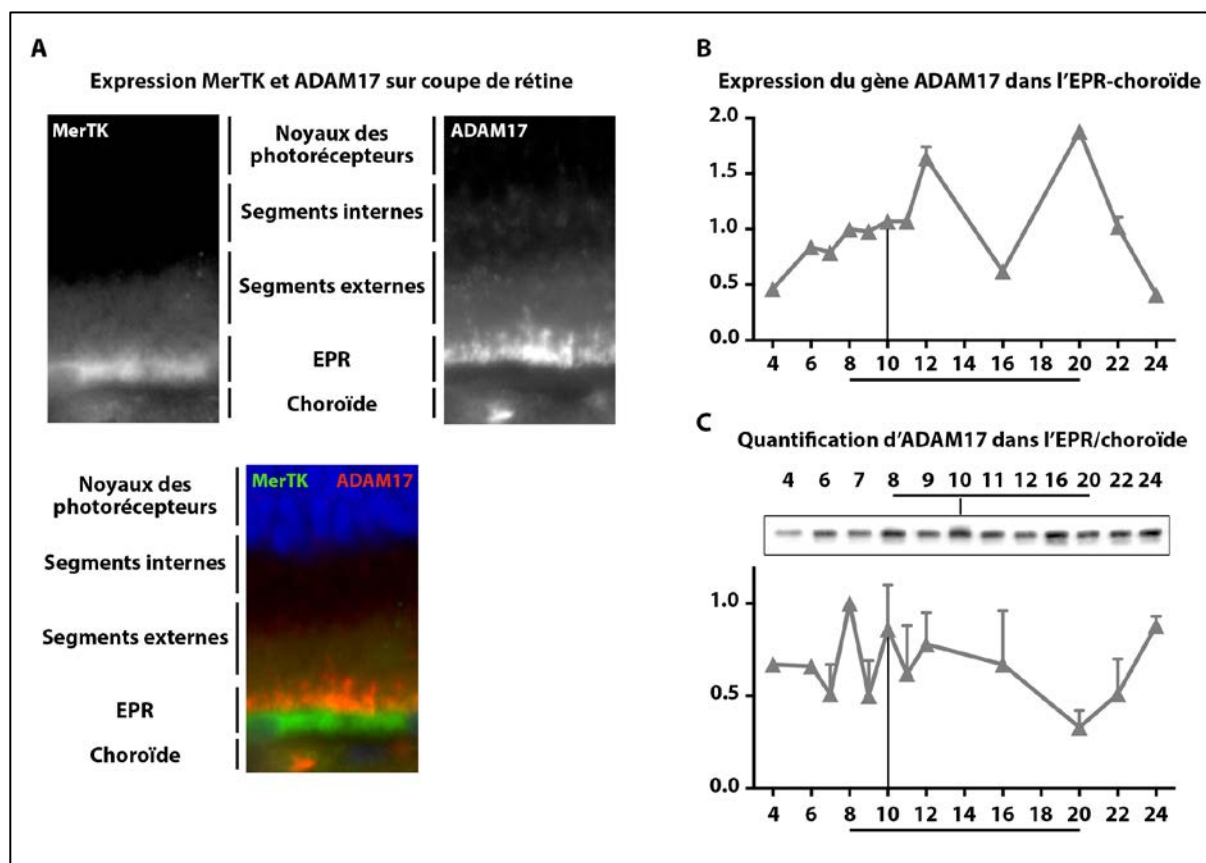
Sur les coupes de rétine de souris, la protéine ADAM10 est présente dans l'EPR et dans la zone des microvilli, de la MIP et des segments externes des photorécepteurs (Figure 18, A). Elle semble colocaliser avec MerTK à certains endroits de la membrane plasmique de l'EPR mais pas au niveau des microvilli courts. L'étude de l'expression du gène ADAM10 dans l'EPR/choroïde révèle deux pics (Figure 18, B). Un pic au moment de l'arrivée de la lumière (8 heures) et le deuxième pic 2 heures après l'extinction de la lumière (22 heures). Entre ces deux pics, son expression est faible, surtout au moment du pic de phagocytose (10 heures). L'expression protéique d'ADAM10 dans l'EPR/choroïde varie peu au cours du temps. Toutefois son expression est plus élevée au moment de l'arrivée de la lumière et à minuit, tandis qu'elle est plus faible au moment du pic de phagocytose (Figure 18, C).



**Figure 18 : Analyse de l'expression d'ADAM10 dans la rétine de souris.**

(A) Marquage immunofluorescent de MerTK (blanc, en haut à gauche ; vert, en bas) et de ADAM10 (blanc, en haut à droite ; rouge, en bas) sur des coupes de rétine de souris incluses en paraffine. ADAM10 est localisée dans la zone des segments externes des photorécepteurs incluant la MIP et les longs microvilli, et dans l'EPR autour du noyau. Analyse de l'expression du gène *ADAM10* (B) par qPCR et de la protéine ADAM10 (C) dans l'EPR/choroïde.  $N = 2-6$  pour (B) et  $N = 2-3$  pour (C) (Voir la figure 16 pour une légende complète).

Dans la rétine ADAM17 est présente au niveau des segments externes des photorécepteurs, et plus précisément dans les microvilli courts de l'EPR (Figure 19, A). Sur cette figure nous ne pouvons voir s'il y a une colocalisation exacte avec MerTK car son marquage est trop faible sur cette série d'expérience. L'analyse de l'expression du gène ADAM17 dans l'EPR/choroïde nous permet de décrire deux pics, un à 12 heures et un au moment de l'extinction de la lumière (20 heures) (Figure 19, B). L'analyse de l'expression de la protéine dans ce même tissu montre plus de variation au cours de la journée. En effet nous pouvons observer une augmentation de son expression au moment de l'arrivée de la lumière et du pic de phagocytose, et avant ces deux pics son expression est faible (Figure 19, C). Son expression diminue ensuite jusqu'à 20 heures puis augmente de nouveau jusqu'à minuit.



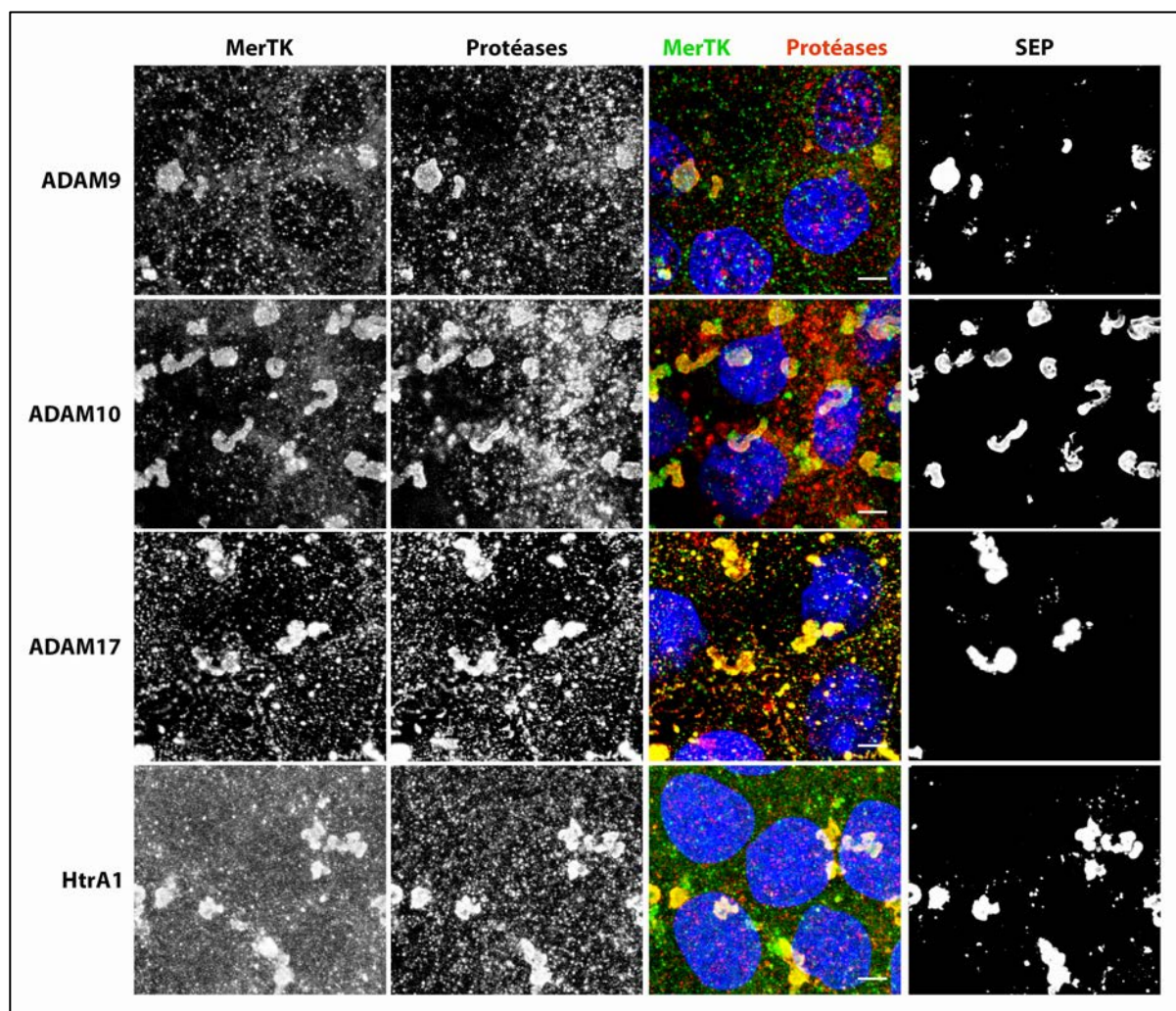
**Figure 19 : Analyse de l'expression d'ADAM17 dans la rétine de souris.**

(A) Marquage immunofluorescent de MerTK (blanc, en haut à gauche ; vert, en bas) et de ADAM17 (blanc, en haut à droite ; rouge, en bas) sur des coupes de rétine de souris incluses en paraffine. ADAM17 est localisée dans les microvilli courts de l'EPR au même endroit que MerTK. Analyse de l'expression du gène *ADAM17* (B) par qPCR et de la protéine ADAM17 (C) dans l'EPR/choroïde.  $N = 3-5$  pour (B) et  $N = 3-8$  pour (C) (Voir la figure 16 pour une légende complète).

#### *b) Certaines protéases colocalisent avec MerTK au cours de la phagocytose in vitro*

La protéase impliquée dans le clivage de MerTK doit être située au même endroit que MerTK au niveau de la membrane plasmique. Nous avons montré *in vitro* que la présence des SEP augmente le clivage de MerTK dans les cellules RPE-J. Nous avons donc regardé la localisation d'ADAM9, 10, 17 et HtrA1 dans les cellules RPE-J après 3 heures de phagocytose quand les quantités de sMerTK sont bien détectables (Law et al., 2015) (Figure 20). Ces protéases sont bien exprimées par les cellules RPE-J et semblent toutes présentes au niveau des SEP. ADAM9 et 10 colocalisent légèrement avec MerTK au niveau des SEP. ADAM17 et HtrA1 colocalisent fortement avec MerTK et les SEP. Mais contrairement à HtrA1, ADAM17 semble colocaliser avec MerTK à certains endroits de la membrane plasmique de manière intrinsèque sans présence de SEP.





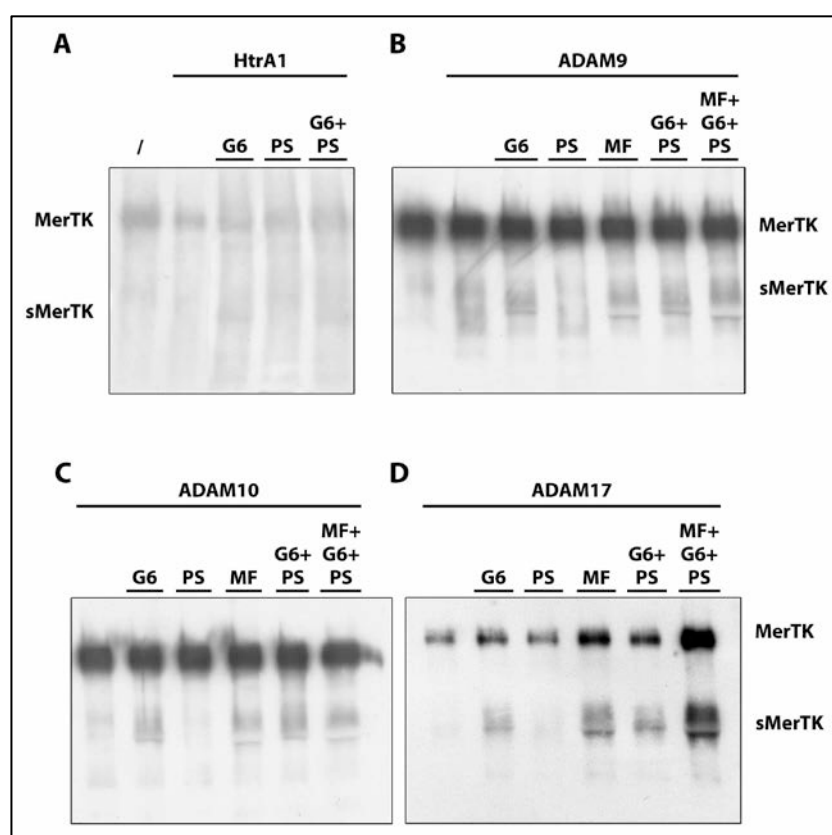
**Figure 20 : ADAM9, 10, 17 et HtrA1 sont localisées au niveau des SEP au cours de la phagocytose *in vitro*.**

Les cellules RPE-J ont été incubées pendant 3 heures avec des SEP, puis marquées pour MerTK (blanc, panneaux de gauche ; vert, 3<sup>ème</sup> série de panneaux en partant de la gauche), les protéases candidates (blanc, 2<sup>ème</sup> série de panneaux en partant de la gauche ; rouge, 3<sup>ème</sup> série de panneaux en partant de la gauche) et les SEP (blanc, panneaux de droite) comme indiqué. MerTK colocalise avec les SEP pour permettre leur internalisation. ADAM9, 10, 17 et HtrA1 sont également localisées au niveau des SEP. ADAM17 et HtrA1 colocalisent plus fortement avec MerTK durant la phagocytose. ADAM17 colocalise avec MerTK en absence de SEP.

Après avoir analysé l'expression circadienne des protéases et leur localisation dans la rétine durant la phagocytose *in vitro*, nous nous sommes intéressés à leur activité protéolytique. Pour vérifier l'activité des protéases à la surface des cellules RPE-J, nous avons utilisé un peptide de synthèse, le Fluorogenic Peptide Substrate III (FPS III) (R&D Systems). Ce peptide, substrat d'ADAM9, 10 et 17, émet de la fluorescence lorsqu'il est clivé. Lorsque les cellules RPE-J sont incubées en présence de ce substrat, une fluorescence est émise très rapidement démontrant que l'une au moins de ces trois protéases est fonctionnelle à leur surface (données non montrées).

### c) ADAM9, 10 et 17 clivent MerTK *in vitro*

Nous avons ensuite réalisé des expériences de digestion *in vitro* de MerTK recombinant avec les protéases recombinantes HtrA1, ADAM9, 10 et 17 afin de savoir si elles sont capables de cliver MerTK (Figure 21). Nous avons validé les conditions des tests de digestions *in vitro* avec les protéines recombinantes ADAM9, 10 et 17 grâce au substrat FPS III. Nous avons également montré que les protéines Gas6, Protéine S et MFG-E8 jouent un rôle dans le clivage de MerTK. Gas6 et MFG-E8 stimulent son clivage tandis que Protéine S l'inhibe. Afin de savoir si ces ligands ont une influence sur ce clivage *in vitro*, nous avons pré-incubé MerTK avec ces ligands seuls ou combinés, puis nous avons ajouté les protéases.



**Figure 21 : Les ligands solubles jouent un rôle sur le clivage de MerTK par ADAM9, 10 et 17 *in vitro*.**

Immunoblots représentant MerTK après pré-incubation avec les ligands Gas6 (G6), Protéine S (PS) et MFG-E8 (MF) seuls ou combinés suivie d'une incubation avec les protéases HtrA1 (A), ADAM9 (B), ADAM10 (C), et ADAM17 (D). ADAM9, 10 et 17 sont capables de cliver MerTK *in vitro* tandis qu'aucune bande n'est détectable à la taille attendue (sMerTK) avec HtrA1. Gas6 stimule le clivage de MerTK par ces 3 protéases tandis que Protéine S aurait tendance à l'inhiber (voir G6 + PS < G6 seul). De manière surprenante, MFG-E8, ligand de l'intégrine  $\alpha\beta 5$ , stimule le clivage de MerTK par ADAM9, 10 et 17.

HtrA1 n'est pas capable de cliver MerTK *in vitro* dans des conditions où un de ses substrats, la beta-caséine, est clivée (donnée non montrée) (Figure 21, A). Les ligands n'ont

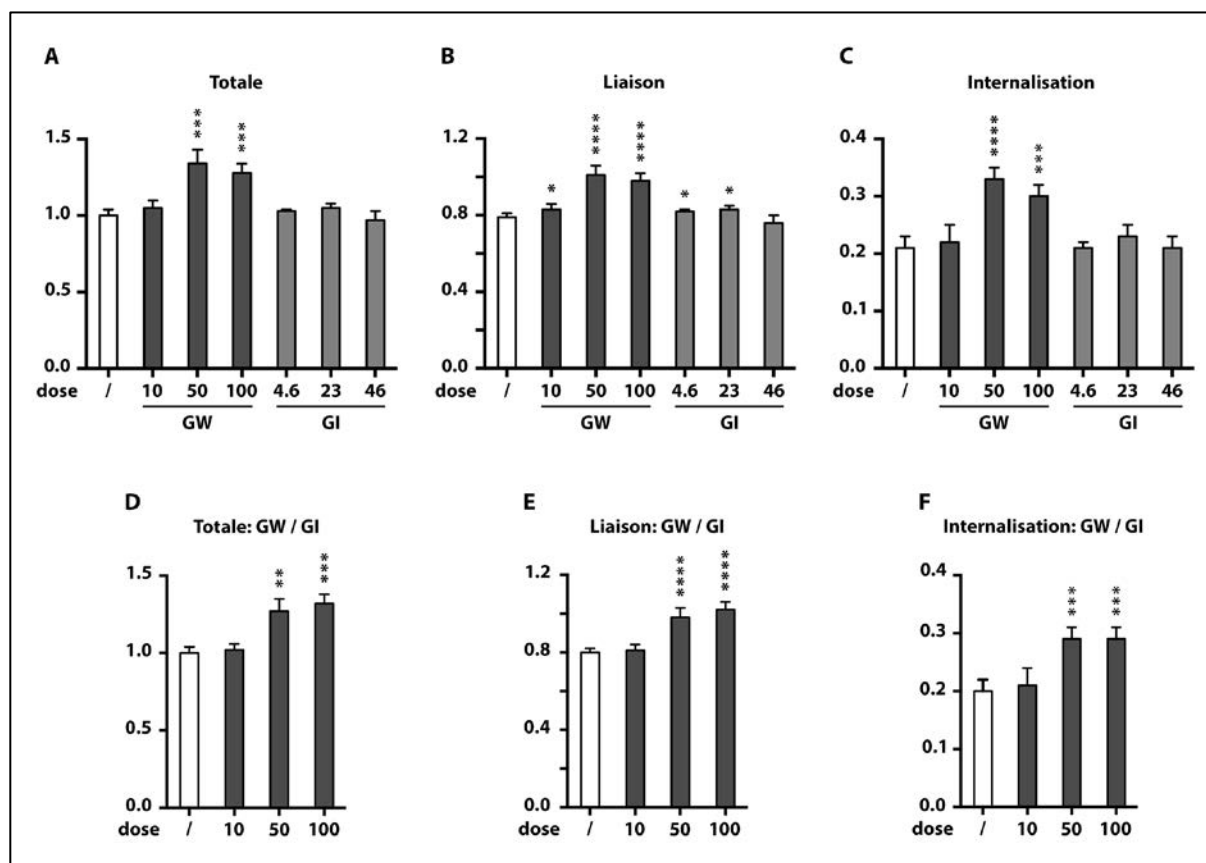
aucune influence sur la capacité d'HtrA1 pour ce clivage. ADAM9, 10 et 17 sont capables de cliver MerTK *in vitro* avec une efficacité supérieure pour ADAM17 (Figure 21, B, C et D). Gas6 augmente le clivage de MerTK effectué par ADAM9, 10 et 17 tandis que Protéine S l'inhibe. Lorsque ces deux protéines sont présentes le profil du clivage semble être similaire à celui avec Gas6 seul. De manière inattendue MFG-E8, le ligand de l'intégrine  $\alpha\text{v}\beta 5$ , stimule le clivage réalisé par ADAM9 et 10 et surtout celui effectué par ADAM17. La présence des trois ligands augmente fortement le clivage de MerTK par ADAM17, montrant un effet cumulatif/synergistique.

#### d) L'inhibition d'ADAM17 augmente l'activation de MerTK et diminue son clivage

Pour identifier plus précisément la protéase responsable du clivage de MerTK, nous avons utilisé un inhibiteur spécifique d'ADAM10, le GI254023X (GI) et un inhibiteur d'ADAM10 et 17, le GW280264X (GW). Leur  $\text{IC}_{50}$  (concentration à laquelle l'activité de la protéase est à moitié inhibée) pour ADAM10 est différent. L' $\text{IC}_{50}$  de GI pour ADAM10 est de 5,3 nM et celui de GW est de 11,5 nM. Afin de pouvoir évaluer uniquement l'effet de l'inhibition d'ADAM17 lors de l'utilisation de GW, nous avons utilisé des concentrations de GW et de GI possédant le même  $\text{IC}_{50}$  pour ADAM10 (10  $\mu\text{M}$  de GW pour 4,6  $\mu\text{M}$  de GI, 50  $\mu\text{M}$  de GW pour 23  $\mu\text{M}$  de GI et 100  $\mu\text{M}$  de GW pour 46  $\mu\text{M}$  de GI). Nous avons ensuite réalisé le ratio entre les données obtenues pour GW et celles obtenues pour GI.

Pour connaître l'effet de l'inhibition d'ADAM10 et d'ADAM17 sur la capacité phagocytaire des cellules RPE-J, nous avons réalisé une phagocytose de 3 heures en présence de ces deux inhibiteurs. En présence de 50  $\mu\text{M}$  et 100  $\mu\text{M}$  de GW, la phagocytose totale, la liaison et l'internalisation des SEP sont augmentées de manière significative (Figure 22, A, B, C). GI ne modifie ni la phagocytose totale ni l'internalisation, il semble toutefois avoir un petit effet stimulateur sur la liaison des SEP pour des doses de 4,6  $\mu\text{M}$  et 23  $\mu\text{M}$  (Figure 22, B). Le ratio de l'effet de GW sur l'effet de GI montre que l'inhibition d'ADAM17 stimule de manière significative la capacité phagocytaire des cellules RPE-J sur les deux étapes de la phagocytose, la liaison et l'internalisation (Figure 22, D, E, F).

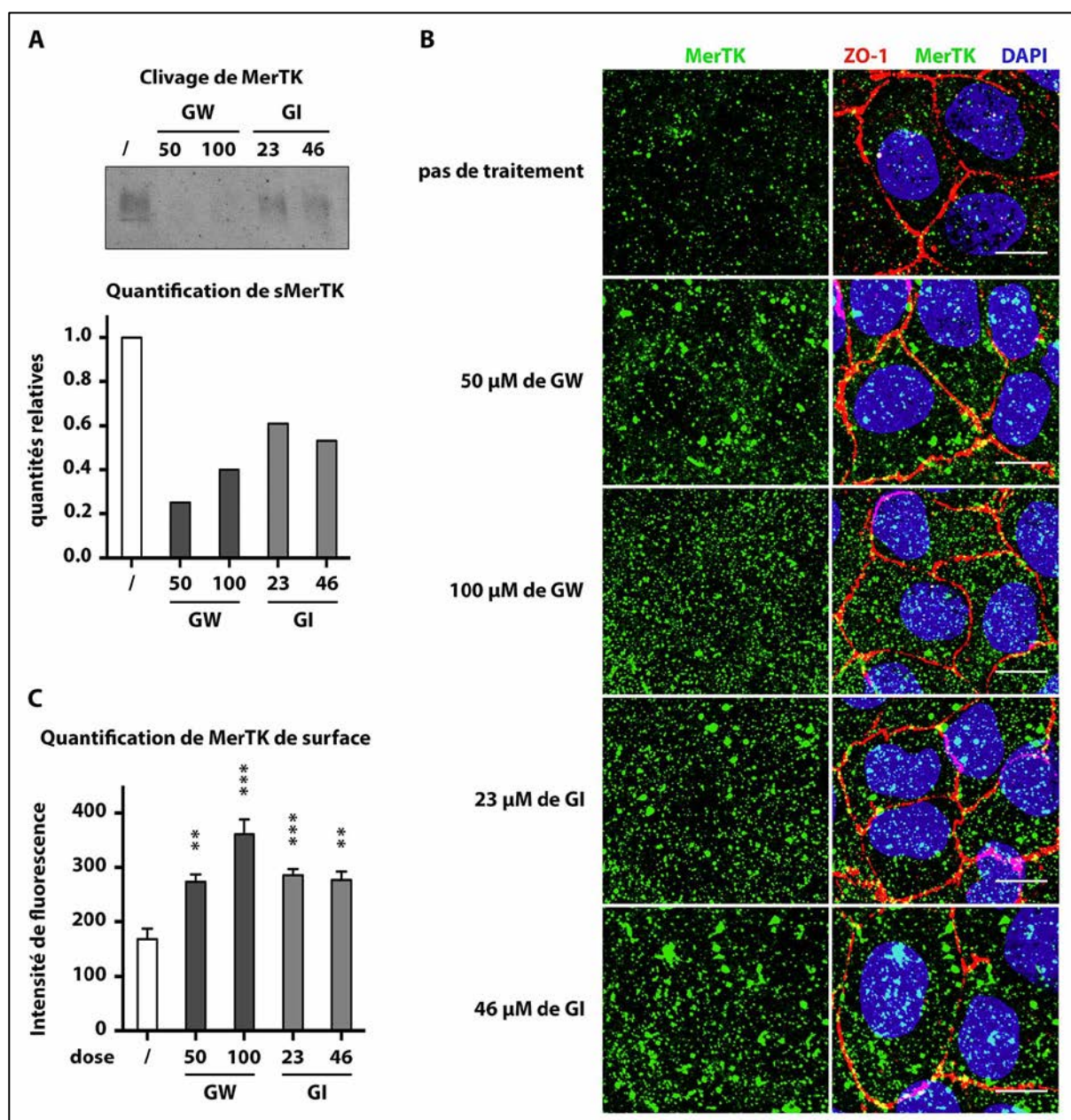




**Figure 22 : L'inhibition d'ADAM17 augmente la capacité phagocytaire des cellules RPE-J.**

Quantification de la quantité relative de la capacité de phagocytose totale (A), de liaison (B) et d'internalisation (C) des cellules RPE-J après 3 heures d'incubation avec des SEP en présence des inhibiteurs GW et GI par rapport à la condition SEP seuls (/). Doses utilisées : 10, 50 et 100  $\mu$ M pour GW ; 4,6, 23 et 46  $\mu$ M pour GI. (D) (E) (F) Ratio de l'effet de GW sur l'effet de GI pour la phagocytose totale (D), la liaison (E) et l'internalisation (F). Moyenne  $\pm$  écart-type,  $N=3-5$ . La significativité a été mesurée avec un test  $t$  de Student en utilisant la condition SEP seuls (/) comme référence ; \*\*,  $P<0,01$  ; \*\*\*,  $P<0,001$  ; \*\*\*\*,  $P<0,0001$ .

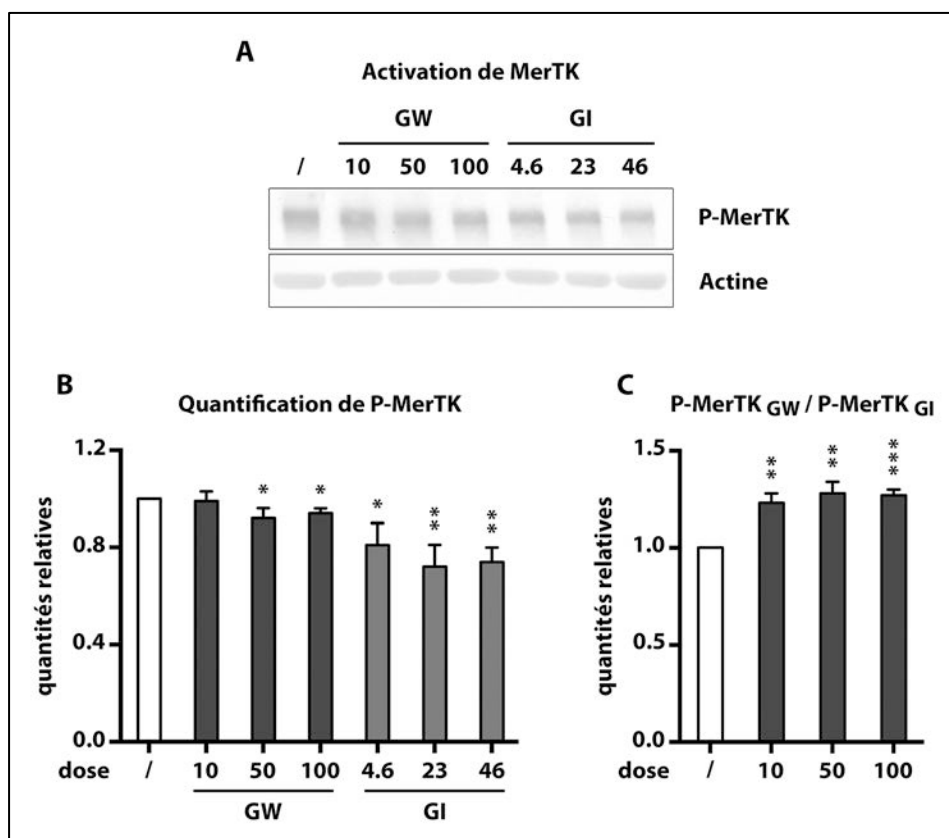
Nous avons quantifié la quantité de sMerTK libéré par les cellules RPE-J dans les mêmes conditions, soit 3 heures de phagocytose en présence des deux inhibiteurs (Figure 23, A). GI et GW diminuent tous deux la quantité de sMerTK présent dans le milieu de culture des cellules, cependant cette diminution est plus importante en présence de GW. Nous avons aussi évalué par immunofluorescence la quantité de MerTK complet présent à la surface des cellules RPE-J par son marquage de surface (Figure 23, B et C). GW et GI augmentent la quantité de MerTK complet présent à la surface des cellules par comparaison avec les cellules n'ayant pas été incubées avec les inhibiteurs. Les doses de 50  $\mu$ M de GW et de 23  $\mu$ M de GI ont le même effet sur la disponibilité du récepteur, tandis que la dose de 100  $\mu$ M de GW a un effet plus important que la dose de 46  $\mu$ M de GI (Figure 23, C).



**Figure 23 : L'inhibition d'ADAM10 et 17 augmente la disponibilité de MerTK à la surface cellulaire.**

(A) Immunoblot représentant la quantité de sMerTK et quantification correspondante de sMerTK dans les milieux de culture des cellules RPE-J suite à une phagocytose de 3 heures en fonction de la dose en  $\mu$ M d'inhibiteurs GW et GI comme indiqué. La quantité de sMerTK diminue dans les milieux des cellules RPE-J en présence de GW (doses utilisées : 50  $\mu$ M et 100  $\mu$ M) et de GI (doses utilisées : 23  $\mu$ M et 46  $\mu$ M) en comparaison avec le milieu de cellules n'ayant été incubées qu'avec les SEP (/).  $N=1$ . (B) Marquage immunofluorescent montrant que la quantité de MerTK, en vert, disponible à la surface cellulaire des cellules RPE-J augmente en présence des inhibiteurs GW et GI. Les jonctions serrées des cellules, marquées avec ZO-1, sont représentées en rouge et les noyaux, contre-colorés avec du DAPI, en bleu. (C) Quantification de la quantité relative de MerTK à la surface cellulaire correspondant au marquage (B) reportée à la condition SEP seuls (/). Moyenne  $\pm$  écart-type,  $N=2-3$ . La significativité a été mesurée avec un test  $t$  de Student en utilisant la condition SEP seuls (/) comme référence ; \*\*,  $P<0,01$  ; \*\*\*,  $P<0,001$ .

Nous avons analysé l'activation de MerTK par sa phosphorylation en présence des inhibiteurs GW et GI (Figure 24). La quantité de MerTK phosphorylé diminue en présence de GW et de GI quand elle est comparée avec les cellules incubées avec uniquement des SEP (Figure 24, A, B). Cependant la diminution est plus importante en présence de GI. Le ratio de la quantité de MerTK phosphorylé en présence de GW sur celle de MerTK phosphorylé en présence de GI montre que l'inhibition d'ADAM17 augmente la phosphorylation et donc l'activation de MerTK (Figure 24, C).



**Figure 24 : L'inhibition d'ADAM17 augmente l'activation de MerTK.**

(A) Immunoblots représentant les variations de la quantité de MerTK phosphorylé (P-MerTK) dans les lysats de cellules RPE-J suite à une phagocytose de 3 heures en fonction de la dose en  $\mu\text{M}$  d'inhibiteurs GW et GI. L'immunoblot de l'actine montre que la même quantité de protéines a été déposée dans chaque puits. (B) Quantification correspondante à l'immunoblot de P-MerTK en (A) reportée à la condition SEP seuls (/). Moyenne  $\pm$  écart-type,  $N=2-3$ . (C) Ratio de la quantité de P-MerTK quantifiée sous l'effet de GW rapportée à celle quantifiée sous l'effet de GI. La significativité a été mesurée avec un test  $t$  de Student en utilisant la condition SEP seuls (/) comme référence ; \*,  $P<0,05$  ; \*\*,  $P<0,01$  ; \*\*\*,  $P<0,001$ .

## 4. Discussion

Afin de caractériser la protéase impliquée dans le clivage de MerTK dans la rétine, nous avons étudié plusieurs candidats choisis pour leur implication dans les pathologies visuelles ou pour leurs caractéristiques fonctionnelles dans d'autres tissus : HtrA1, ADAM9, 10 et 17. Dans la rétine, le clivage de MerTK étant rythmique, la/les protéase/s impliquée/s dans ce clivage doit/doivent être exprimée/s au même endroit que MerTK et être active au bon moment. L'analyse de la localisation de nos candidats sur coupe de rétine montre que HtrA1, ADAM9 et ADAM10 sont exprimées dans la zone correspondant aux SEP et microvilli longs de l'EPR, tandis qu'ADAM17 est présente au niveau des microvilli courts de l'EPR, qui sont impliqués dans la phagocytose des SEP et qui sont enrichis en MerTK. Nous avons analysé les profils d'expression au cours du rythme circadien des gènes et des protéines correspondants à nos candidats dans l'EPR/choroïde.

L'expression du gène *HtrA1* diminue à l'arrivée de la lumière jusqu'à 12 heures, tandis que la quantité de protéine dans la MIP augmente entre l'arrivée de la lumière et le pic de phagocytose quand elle est maximale. Cette augmentation de la protéine HtrA 1 dans la MIP au moment du pic de phagocytose pourrait montrer son implication dans la phagocytose des SEP. En ce qui concerne ADAM9, nous devons encore acquérir des données supplémentaires sur son profil d'expression protéique dans l'EPR/choroïde. Toutefois, avec nos données actuelles, nous pouvons observer une faible quantité d'ADAM9 au moment du pic de phagocytose, et une grande quantité juste après ce pic. ADAM10, quant à lui, est fortement exprimé avant le pic de phagocytose et 2 heures après l'extinction de la lumière. La quantité de protéine ADAM10 dans l'EPR/choroïde varie peu autour du pic de phagocytose et est faible à ce moment. *ADAM17* est fortement exprimé à deux moments dans la journée : à 12 heures et au moment de l'extinction de la lumière. Ce profil d'expression est presque similaire à celui de la protéine dans l'EPR/choroïde. En effet, la protéine ADAM17 est présente en grande quantité au moment de l'arrivée de la lumière, du pic de phagocytose et vers minuit. Le profil d'expression de la protéine ADAM17 semble corrélérer avec le profil de clivage de MerTK, faisant d'ADAM17 un bon candidat pour le clivage de MerTK (Law et al., 2015). Nous avons également observé la localisation des candidats *in vitro* dans les cellules RPE-J au cours de la phagocytose. Les récepteurs MerTK ont été marqués avant fixation des cellules afin de détecter uniquement ceux présents à la surface cellulaire, tandis que les protéases ont été marquées après fixation. Etrangement HtrA1 colocalise avec MerTK au niveau des SEP, alors qu'elle est sécrétée. Il serait donc possible qu'HtrA1 reconnaisse des

cibles à la surface des SEP ou de l'EPR impliquées dans le processus de phagocytose. Au niveau des SEP, ADAM9 et 10 colocalisent légèrement avec MerTK, tandis qu'ADAM17 présente une forte colocalisation avec MerTK. De plus, ADAM17 est la seule candidate qui colocalise avec MerTK de manière intrinsèque à certains endroits de la membrane plasmique sans présence des SEP. Ceci pourrait expliquer le clivage observé quand les cellules ne sont soumises ni aux SEP ni aux ligands. Ainsi, ces données renforcent notre hypothèse sur l'implication d'ADAM17 dans le clivage de MerTK.

Afin d'analyser la capacité de ces protéases pour le clivage de MerTK, nous avons réalisé des digestions *in vitro* de protéines recombinantes. ADAM9, 10 et 17 clivent bien MerTK. HtrA1 est la seule à ne pas pouvoir cliver MerTK dans des conditions validées sur un autre substrat. De plus, la présence des ligands Gas6, Protéine S et MFG-E8 semble moduler la capacité d'ADAM9, 10 et 17 à cliver MerTK. En effet, Gas6 et MFG-E8 stimulent le clivage de MerTK, tandis que Protéine S l'inhibe. Ces données confirment les résultats obtenus précédemment et qui montrent un rôle opposé entre Gas6 et Protéine S (Law et al., 2015).

Afin de raffiner notre analyse des candidats, nous avons utilisé un inhibiteur sélectif pour ADAM10 et un autre qui inhibe ADAM10 et 17. L'inhibition d'ADAM10 ne semble pas avoir d'effet sur la capacité phagocytaire des cellules RPE-J, malgré une diminution du clivage de MerTK corrélée à une augmentation de la disponibilité du récepteur complet à la surface des cellules. De plus, l'inhibition d'ADAM10 entraîne une diminution de la quantité de MerTK activé. L'inhibition d'ADAM17 obtenue en calculant le ratio de l'effet de l'inhibition d'ADAM10 et 17 sur l'effet de l'inhibition d'ADAM10, stimule l'internalisation et la liaison des SEP, diminue le clivage de MerTK et augmente la disponibilité du récepteur à la surface des cellules et augmente également l'activation de MerTK.

L'ensemble de nos données montre qu'ADAM17 est impliquée dans le clivage de MerTK dans la rétine, de par la variation de son expression au cours du rythme circadien dans la rétine, de sa localisation dans les microvilli de l'EPR, de sa capacité à cliver MerTK *in vitro* et par les conséquences de son inhibition. Cependant, ADAM17, comme c'est le cas dans d'autres tissus, ne semble pas être seule responsable de cette fonction régulatrice. En effet, ADAM9 et 10 sont capables de cliver MerTK *in vitro*, et malgré l'inhibition d'ADAM10 et 17, MerTK est toujours clivé. Des réponses plus précises pourront être apportées par l'analyse du phénotype rétinien et de la phagocytose chez des souris pour lesquelles une ou plusieurs de ces trois protéases auront été inactivées.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La phagocytose des SEP par l'EPR est essentielle pour maintenir la fonctionnalité et la survie des photorécepteurs et donc la vision. Au niveau moléculaire, cette phagocytose est similaire à celle effectuée par les macrophages pour éliminer les cellules apoptotiques. Cependant, l'EPR est différent des macrophages car il est en contact permanent avec les SEP et la phagocytose n'a lieu qu'à un moment précis de la journée –2 heures après l'arrivée de la lumière–, tandis que les macrophages phagocytent les cellules apoptotiques dès qu'un contact est établi. Ces deux types de cellules utilisent deux intégrines différentes pour établir la liaison des particules à éliminer –intégrine  $\alpha\beta3$  chez le macrophage et  $\alpha\beta5$  chez l'EPR– et MerTK comme récepteur permettant l'internalisation. Dans la rétine ces deux récepteurs sont essentiels car tout défaut fonctionnel de l'un d'entre eux peut être à l'origine de pathologies visuelles plus ou moins précoces comme des dystrophies bâtonnets-cônes ou la DMLA. Du fait du rythme circadien de la phagocytose rétinienne et du contact permanent entre les SEP et l'EPR, la machinerie de la phagocytose rétinienne doit être finement régulée afin d'accomplir la phagocytose au bon moment et de la limiter dans le temps. *In vivo*, MerTK est activé intracellulairement par l'intégrine  $\alpha\beta5$  et son ligand MFG-E8 afin de déclencher le pic quotidien de la phagocytose (Nandrot et al., 2004; Nandrot et al., 2007).

Les mécanismes permettant de réguler l'activité de MerTK pour limiter la durée de cette phagocytose et empêcher l'internalisation d'une trop grande quantité de SEP dans l'EPR étaient encore inconnus. Au cours de mon Doctorat, je me suis donc intéressée aux régulations extracellulaires de l'activité de MerTK au cours de la phagocytose rétinienne en étudiant particulièrement le rôle de ses deux ligands, Gas6 et Protéine S, et du clivage de son ectodomaine en récepteur soluble (sMerTK). En effet, de nombreuses études réalisées sur les macrophages ont montré l'importance de Protéine S et de sMerTK dans la clairance des cellules apoptotiques (Anderson et al., 2003; Sather et al., 2007). Gas6 et Protéine S permettent la dimérisation des récepteurs MerTK conduisant à leur autophosphorylation et permettent ainsi l'activation des voies de signalisation intracellulaires (Ling et al., 1996; Sasaki et al., 2006). De plus, en 2012, la génération de souris double déficientes pour *Protéine S* et *Gas6* a montré pour la première fois leur nécessité dans la phagocytose rétinienne (Burstyn-Cohen et al., 2012). Une autre étude a quant à elle permis en 2011 d'identifier ADAM17 comme la principale protéase responsable du clivage de MerTK dans les macrophages (Thorp et al., 2011).

Durant mon Doctorat, j'ai pu mettre en évidence le clivage de MerTK dans la rétine *in vivo*, libérant ainsi sMerTK dans la MIP de façon rythmique (Law et al., 2015). Ce clivage, qui augmente après la fin du pic de phagocytose, pourrait limiter l'activation des nouveaux récepteurs MerTK qui sont synthétisés par l'EPR/choroïde à 11 heures et 16 heures et ainsi restreindre l'activité phagocytaire des cellules de l'EPR en dehors du pic. Comme dans les macrophages, nous avons montré que sMerTK peut servir d'appât et lier Gas6 et Protéine S *in vitro* pour bloquer leurs activités (Law et al., 2015; Sather et al., 2007). Ce clivage entraîne également une diminution de la disponibilité des récepteurs complets à la surface cellulaire réduisant ainsi l'activité phagocytaire de ces cellules *in vitro*. Nous ne savons pas si le clivage s'effectue sur des récepteurs sous forme de dimères activés ou inactivés, ou encore sous forme de monomères. Cependant, nous avons montré que, comme pour les macrophages, sans stimulation par les SEP et sans les ligands Gas6, Protéine S ou MFG-E8, les cellules RPE-J libèrent sMerTK dans le milieu de culture. Ceci suggère que le clivage est un phénomène constitutif qui peut s'effectuer sur les monomères de MerTK chez les macrophages et dans l'EPR. Nous pensons que la protéine MerTK qui est liée aux SEP n'est pas soumise au clivage car elle permet l'internalisation de ces SEP dans les cellules. Le sMerTK libéré proviendrait plutôt des protéines présentes à la surface membranaire qui ne sont pas réquisitionnées pour la phagocytose. Nous avons également montré que ce clivage peut être inhibé par TAPI-0 *in vitro* comme dans les macrophages (Sather et al., 2007). Cette inhibition de clivage entraîne une augmentation de la liaison des SEP à la surface des cellules. TAPI-0 inhibe de nombreuses protéases, incluant ADAM17, la principale protéase responsable du clivage de MerTK dans les macrophages. Dans le but d'identifier la/les protéase/s responsable/s de ce clivage nous avons étudié plusieurs candidats choisis pour leur implication dans les pathologies visuelles ou pour leurs caractéristiques fonctionnelles dans d'autres tissus : HtrA1, ADAM9, 10 et 17. La protéase doit être présente dans la rétine au même endroit que MerTK et être fortement active au bon opportuniste, soit avant l'arrivée de la lumière, après le pic de phagocytose, et entre 16 heures et 20 heures pour assurer le clivage rythmique observé, et doit diminuer juste avant ce pic pour qu'il puisse exister.

Les nombreuses études effectuées sur les protéases de la famille ADAM montrent une complexité dans leur mode d'action en plus de leur forme transmembranaire active. Ainsi, ADAM9 possède une isoforme qui peut être sécrétée. ADAM10 peut elle être liée à son prodomaine au niveau de la membrane, la rendant ainsi inactive, et peut également être soumise à un clivage par ADAM9 libérant son domaine catalytique toujours actif dans la



matrice extracellulaire (Cissé et al., 2005; Hotoda et al., 2002; Moss et al., 2007). En ce qui concerne ADAM17 aucune forme sécrétée ou clivée n'a été identifiée jusqu'à présent, et lorsqu'elle est présente à la surface des cellules elle semble être active. L'étude de la localisation de nos candidats dans les rétines de souris au moment du pic de phagocytose montre que seule ADAM17 est exprimée dans les microvilli courts de l'EPR, qui sont enrichis en MerTK. Malheureusement les coupes présentées ne sont pas de qualité suffisante pour permettre de voir une colocalisation parfaite d'ADAM17 avec MerTK. Nous devons également effectuer ces mêmes marquages à des heures différentes de la journée afin de savoir si l'expression d'une de ces protéases varie et corrèle avec le profil de sMerTK détecté dans la MIP.

Les profils d'expression protéique de protéases étudiées dans l'EPR/choroïde présentent tous des variations au cours de la journée. Le profil correspondant le plus à celui du clivage de MerTK est celui d'ADAM17. En effet, il y a une augmentation de la quantité de protéines ADAM17 au moment de l'arrivée de la lumière et du pic de phagocytose, heures pour lesquelles le clivage de MerTK est légèrement augmenté. Cependant la quantité d'ADAM17 à 20 heures est faible tandis que celle de sMerTK est élevée. ADAM9 et 10 pouvant être présentes sous forme active dans la MIP, il faudrait aussi prendre en compte la quantité de ces deux protéases (données en cours d'obtention). L'analyse *in vivo* des profils d'expression dans la rétine est un travail assez complexe avec de nombreuses variations entre les individus. De plus en retirant la rétine de l'EPR, nous cassons les microvillosités de cet EPR qui se retrouvent de ce fait côté rétine. Etant donné la localisation de MerTK dans les microvilli, il est possible qu'une partie des protéases se retrouve dans la rétine et ne puisse pas être quantifiée dans les lysats d'EPR/choroïde. Toutefois, la séparation de ces deux tissus doit être rapide afin que les tissus soient disséqués à des heures précises. Nous ne pouvons donc pas utiliser des enzymes de digestion de la matrice extracellulaire qui permettent une séparation douce et spécifique de ces deux tissus et que nous utilisons dans d'autres types d'expériences comme la purification d'EPR pour mise en culture primaire.

Nous avons également regardé *in vitro* si ces protéases colocalisent avec MerTK durant la phagocytose. L'ensemble des candidats colocalise avec MerTK au niveau des SEP, tandis que ADAM17 colocalise avec MerTK au niveau de la surface membranaire sans stimulation des cellules, ce qui pourrait expliquer la production intrinsèque de sMerTK. ADAM17 est donc un bon candidat pour le clivage de MerTK dans les cellules RPE-J.



Nous avons analysé la présence des protéases dans les lysats d'EPR/choroïde (ADAM) ou dans la MIP (HtrA1) au cours du temps, cependant la présence de la protéine n'indique pas son activité pour le clivage de MerTK. En effet dans les cellules, certaines ADAM matures (sans prodomaine) sont retenues dans un compartiment intracellulaire proche du noyau, comme c'est le cas pour ADAM10, 15 et 17 (Dallas et al., 1999; Lum et al., 1998; Schlöndorff et al., 2000). De plus, comme nous l'avons vu précédemment, ADAM10 peut être présente à la surface membranaire et inactivée par la présence de son prodomaine. Il serait intéressant de connaître leur profil d'activité au cours de la journée. De même il serait intéressant d'analyser l'activité de ces protéases *in vitro* dans les cellules RPE-J au cours de la phagocytose. Ainsi, nous avons démontré que les protéases exprimées à la surface des cellules RPE-J sont actives par le clivage d'un peptide de synthèse substrat d'ADAM9, 10 et 17. Pour restreindre la liste des candidats impliqués dans le clivage de MerTK, nous avons d'abord réalisé des digestions *in vitro* de protéines recombinantes afin de savoir si ces protéases avaient la capacité de cliver MerTK. Nous avons pu montrer que HtrA1 ne clive pas MerTK dans les conditions testées tandis que ADAM9, 10 et 17 en sont capables. Nous avons également utilisé des inhibiteurs pharmacologiques spécifique d'ADAM10 ou d'ADAM10 et 17. Les résultats obtenus montrent clairement qu'ADAM17 est impliquée dans le clivage de MerTK *in vitro* dans les cellules RPE-J. ADAM10 semble elle aussi impliquée dans le clivage de MerTK, cela sans modifier son activation et donc la capacité phagocytaire des cellules. Cependant, avec ces inhibiteurs nous n'avons pas pu observer l'effet de l'inhibition seule d'ADAM17. Nous ne pouvons donc pas affirmer une implication unique d'ADAM17 dans le clivage de MerTK. Cette possibilité ne peut pas être exclue car elle existe dans d'autres systèmes. En effet, chez les souris déficientes pour *ADAM17*, certains substrats de cette protéase sont toujours clivés, démontrant un partage des substrats par les différentes ADAM et surtout entre ADAM9, 10 et 17 (Hikita et al., 2009; Primakoff and Myles, 2000; Reddy et al., 2000). Avec l'inhibition d'ADAM10 et 17, nous observons toujours du clivage de MerTK, suggérant soit l'implication d'une autre protéase comme ADAM9, qui est aussi capable de cliver MerTK *in vitro*, soit une inhibition non totale de ces deux protéases.

Afin d'identifier plus clairement la protéase responsable du clivage de MerTK, il serait intéressant d'étudier ce clivage chez des souris déficientes pour *ADAM17* ou *ADAM10* uniquement dans l'EPR. Nous avons très récemment développé une collaboration avec le Professeur Duska Sidjanin du Medical College of Wisconsin (Milwaukee, Etats-Unis), qui possède des souris conditionnelles déficientes pour *ADAM17* dans la rétine, l'EPR et une

partie du cerveau antérieur (enzyme Cre sous le contrôle du promoteur de Six3). A 4 mois, les rétines de ces souris ne présentent pas de phénotype particulier comparées aux souris contrôles. En effet, à cet âge les souris possèdent le même nombre de noyaux sur toute l'épaisseur de la rétine que les souris sauvages, confirmant une absence de dégénérescence rétinienne (données obtenues au laboratoire). De plus, les électrorétinogrammes (ERG) réalisés sur ces mêmes souris ne montrent pas de défaut fonctionnel des photorécepteurs (données fournies par le Pr Sidjanin). Cependant, certains phénotypes visuels peuvent se développer tardivement comme chez les souris *intégrine  $\beta 5^{-/-}$*  pour lesquelles le rythme de phagocytose est absent et dont la perte progressive de la fonctionnalité des photorécepteurs n'a lieu qu'à partir de l'âge de 6 mois (Nandrot et al., 2004). Notre hypothèse est qu'une modification du profil de clivage de MerTK altérerait le rythme de phagocytose. Nous devons donc laisser vieillir les souris afin d'analyser à nouveau le phénotype de la rétine. Il est également possible que ces souris ne développent pas de phénotype rétinien, ce qui pourrait être dû à une compensation de clivage par les autres ADAM si ADAM17 est bien la protéase responsable en majorité de ce clivage. Auquel cas il serait intéressant de générer des animaux pour lesquels plusieurs ADAM sont inactivées dans la rétine.

Nous avons également une collaboration avec l'équipe du Prof Ira Tabas, de Columbia University (New York, Etats-Unis), dont l'équipe a identifié la protéase ADAM17 comme responsable du clivage de MerTK dans les macrophages et a caractérisé le site de clivage au niveau de la proline 485 et de la sérine 486 (Thorp et al., 2011). Ils ont créé une lignée de souris mutées au niveau de ce site de clivage sur MerTK empêchant ainsi la libération de sMerTK dans la matrice extracellulaire. Les souris étant générées depuis peu de temps, nous n'avons pas encore eu accès aux animaux mais le « Material and Transfer Agreement » est en place entre nos deux laboratoires. Il sera en effet intéressant de savoir si le rythme de la phagocytose est affecté et si l'absence de clivage de MerTK dans la rétine conduit à des pathologies rétiniennes. Nous pourrions également comparer ces deux lignées de souris, déficientes pour ADAM17 et déficientes pour le clivage de MerTK, afin d'observer si elles développent le même phénotype. Ces souris pourraient également confirmer le rôle de sMerTK que nous avons identifié *in vitro* dans les cellules RPE-J, pour la phagocytose rétinienne *in vivo*.

Au cours de mon Doctorat j'ai également étudié la régulation de l'activité de MerTK par ses deux ligands Gas6 et Protéine S. Nous avons montré que les ligands MFG-E8, Gas6 et Protéine S modulent la phagocytose des SEP et le clivage de MerTK par les cellules RPE-J. Comme attendu, MFG-E8, ligand de l'intégrine  $\alpha\beta 5$ , stimule fortement la capacité phagocytaire des cellules RPE-J. De manière surprenante, et contrairement aux macrophages, les deux ligands de MerTK présentent entre eux des rôles opposés, moins prononcés que celui de MFG-E8. En effet, Gas6 diminue la phagocytose des SEP –notamment l'internalisation– et stimule le clivage de MerTK, tandis que Protéine S stimule cette phagocytose et diminue le clivage de MerTK (Law et al., 2015). Nous avons également étudié le profil d'expression de ces trois ligands dans la rétine. L'analyse du profil d'expression de MFG-E8 dans la MIP montre une augmentation au moment de l'arrivée de la lumière et du pic de phagocytose. Cette augmentation dans la MIP pourrait permettre de déclencher le pic de phagocytose en liant l'intégrine  $\alpha\beta 5$ , pour activer MerTK (Nandrot et al., 2004; Nandrot et al., 2007). L'augmentation de la quantité Protéine S dans la MIP au moment du pic de phagocytose pourrait potentialiser l'activation de MerTK. La quantité de Gas6 est faible dans la MIP juste avant le pic de phagocytose et augmente jusqu'à 11 heures ce qui pourrait inhiber la phagocytose avant et après ce pic. Ainsi, nos données *in vivo* tendent à confirmer nos données *in vitro* sur les rôles distincts de Gas6 et Protéine S dans la phagocytose. De plus, lors des expériences de digestions *in vitro* de MerTK par les protéases candidates ADAM9, 10 et 17, Gas6 et Protéine S modulent ce clivage. En effet, la pré-incubation de MerTK avec Gas6 stimule le clivage tandis que la pré-incubation avec Protéine S l'inhibe. Ces données renforcent donc nos résultats précédents. Nous pensons que Gas6 pourrait avoir un effet inhibiteur constant sur MerTK et qu'au moment du pic de phagocytose, Protéine S, dont la quantité augmente ponctuellement dans la MIP, pourrait lier MerTK malgré la présence de Gas6. Ceci suggère une compétition potentielle entre les deux ligands. Des études ont montré que MerTK est le récepteur TAM possédant la plus faible affinité pour Gas6 (Chen et al., 1997; Nagata et al., 1996). Il est donc possible que MerTK ait une affinité plus importante pour Protéine S que pour Gas6 ce qui favoriserait l'échange entre les deux ligands au moment du pic de phagocytose. Une autre possibilité serait liée à la stœchiométrie de chaque ligand en fonction des heures de la journée. Nous avons donc quantifié les quantités de chaque ligand présent dans la MIP par des ELISA. Les données sur la quantité de Gas6 dans la MIP doivent être complétées afin d'obtenir un profil similaire à celui provenant des données des immunoblots. En ce qui concerne Protéine S, malgré l'utilisation de plusieurs kits ELISA, nous n'avons pu trouver un kit suffisamment spécifique pour la Protéine S de souris. Nous

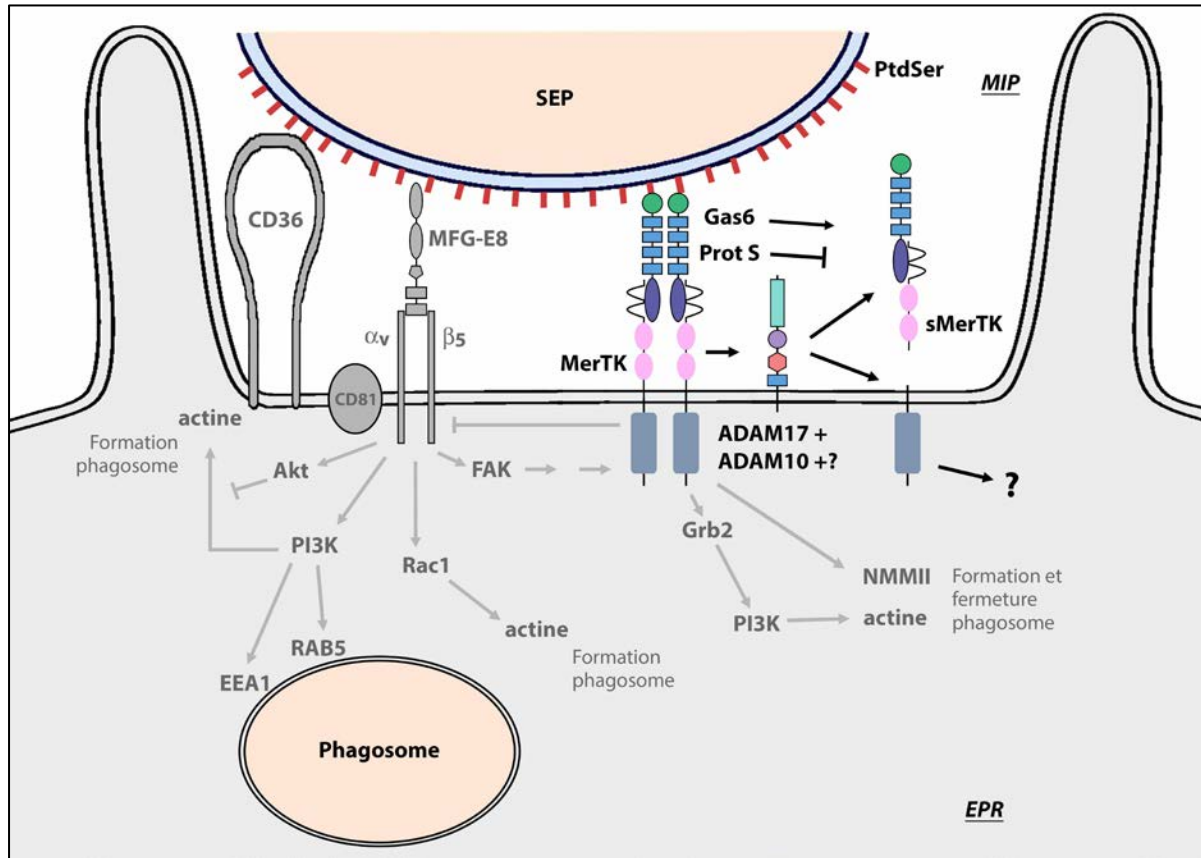
avons également pré-incubé MerTK avec MFG-E8 avant l'incubation avec les protéases ADAM9, 10 ou 17, ce qui a fortement augmenté le clivage de MerTK. Nous ne nous attendions pas à un effet de MFG-E8 dans le clivage *in vitro* de la protéine recombinante MerTK par une autre protéine recombinante (ADAM). En effet, il n'a jamais été montré que MFG-E8 peut lier MerTK ou des membres de la famille ADAM.

Une étude effectuée sur le récepteur Axl, de la même famille que MerTK, a montré l'existence de deux sites de liaison pour les ligands, un site majeur et un site mineur (Sasaki et al., 2006). La structure de ces deux récepteurs étant très proche, nous avons posé l'hypothèse que MerTK pourrait présenter ces mêmes sites de liaison aux ligands. Nous avons voulu savoir si les deux ligands utilisent le même site de fixation sur MerTK ou s'il y a un site de liaison pour chaque ligand. Nos résultats d'expérience de mutagenèse suggèrent que Gas6 et Protéine S se fixeraient sur des acides aminés différents du site majeur. La liaison de Gas6 avec MerTK pourrait modifier la structure tridimensionnelle du récepteur et rendre accessible le site de clivage de MerTK pour la protéase tandis que la liaison de MerTK avec Protéine S pourrait bloquer ce site de clivage. A l'inverse, il est également possible que l'activation de MerTK par l'intégrine  $\alpha\beta 5$  provoque un changement de conformation rendant MerTK moins affin pour Gas6 et plus pour Protéine S. La présence de sMerTK dans les milieux de culture des cellules RPE-J sans stimulation préalable, nous amène à penser que le clivage de MerTK peut s'effectuer sur les monomères et serait un mécanisme général qui limite l'action de MerTK même sans stimulation. Cependant, la présence de Gas6 augmentant la quantité de sMerTK, ce clivage semble pouvoir s'effectuer sur des dimères de MerTK actifs. La question suivante se pose alors : les récepteurs dimérisés qui ne possèdent plus leur domaines extracellulaires sont-ils toujours activés ? Une étude a analysé les conséquences du clivage d'Axl sur la fonctionnalité de ce récepteur (O'Bryan et al., 1995). Lorsqu'Axl est clivé la partie membranaire restante est toujours phosphorylée, et pourrait ainsi toujours activer des voies de signalisation intracellulaires. Cependant, le temps de demi-vie de ce récepteur est nettement diminué par rapport à celui du récepteur complet, indiquant que le clivage d'Axl permet d'inhiber sa fonction. Une des approches pour caractériser leur devenir serait de suivre des récepteurs MerTK marqués avec un tag fluorescent par vidéomicroscopie.

L'effet de Gas6 et de Protéine S sur la capacité phagocytaire des cellules est beaucoup moins prononcé que l'effet de MFG-E8. Nous pensons que ces deux ligands permettent de contrôler précisément la capacité phagocytaire des cellules en régulant la quantité de MerTK disponible et activable à la surface des cellules. Cette hypothèse pourrait expliquer l'absence

de phénotype visuel chez les souris déficientes pour un seul de ces ligands, alors que les souris double déficientes pour *Gas6* et *Protéine S* dans la rétine développent le même phénotype que les rats RCS et les souris Mer<sup>kd</sup> (Burstyn-Cohen et al., 2012). En effet, MerTK, comme tous les récepteurs TAM, fonctionne sous forme de dimère. La dimérisation des récepteurs s'effectue en présence de leurs ligands et permet l'autophosphorylation de résidus tyrosines du domaine tyrosine kinase et l'activation potentielle des voies de signalisation (Ling et al., 1996; Sasaki et al., 2006). Cependant les ligands seuls ne permettent pas une activation maximale des récepteurs. En effet, d'autres facteurs entrent en jeu tels que la liaison des ligands aux PtdSer et la présence de calcium dans la matrice extracellulaire (Lew et al., 2014). L'absence d'un des ligands ne bloque pas la dimérisation alors que l'absence des deux empêche cette dimérisation, provoquant un phénotype équivalent à celui obtenu en l'absence de récepteur puisqu'il ne peut pas être activé. Ceci suggère que la variation des ions calcium dans la MIP pourrait aussi jouer un rôle dans le contrôle de la phagocytose rétinienne.

En conclusion, mes travaux de Doctorat mettent en évidence de nouveaux mécanismes de régulation de l'activité de MerTK dans la phagocytose des SEP par l'EPR, qui jusqu'à présent avait surtout été étudiés chez les macrophages (Figure 25). Bien que la machinerie phagocytaire utilisée par les macrophages pour éliminer les cellules apoptotiques soit similaire à celle utilisée par l'EPR pour phagocyter les SEP, nous avons démontré pour la première fois que certains mécanismes de régulation de ces processus sont différents. Ces différences sont liées au contact permanent entre les SEP et l'EPR et à la nécessité de maintenir le rythme circadien de la phagocytose rétinienne. Ainsi, comme chez les macrophages, MerTK est clivé, libérant dans la MIP son ectodomaine. Dans la rétine *in vivo*, ce clivage varie au cours de la journée suivant un rythme circadien. Nous avons montré qu'ADAM17 pourrait être impliquée dans ce clivage tout comme c'est le cas chez les macrophages. Chez les macrophages, *Gas6* et *Protéine S* stimulent de la même façon leur activité phagocytaire, alors que chez les cellules RPE-J, *Gas6* diminue l'activité phagocytaire et *Protéine S* la stimule. Nous avons également montré l'implication opposée de ces deux ligands sur le clivage de MerTK, ce qui n'a jamais été étudié chez le macrophage.



**Figure 25 : Les acteurs de la phagocytose rétinienne après mes travaux de Doctorat.**

Schéma représentant les récepteurs impliqués dans la phagocytose rétinienne et leurs voies de signalisation. Les récepteurs et voies de signalisation déjà connus apparaissent en gris (pour plus de détails voir la Figure 10). La contribution de mes travaux de Doctorat sur la compréhension de la régulation de cette phagocytose rétinienne apparaît en couleur. Ainsi MerTK est clivé à la surface cellulaire par ADAM17, 10 et peut-être une autre protéase, libérant dans la MIP son ectodomaine sMerTK. sMerTK peut lier les ligands Gas6 et Protéine S afin d'inhiber leur action [*Modifié d'après van der Meer, 2014*].

Les résultats de mes recherches nous permettent de mieux appréhender la complexité du fonctionnement de la phagocytose rétinienne et ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension de l'activation des récepteurs TAM impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques.

Les récepteurs TAM remplissent deux fonctions biologiques majeures : la clairance des cellules apoptotiques et la régulation négative des réponses inflammatoires (Lemke and Burstyn-Cohen, 2010). La clairance des cellules apoptotiques intervient pour réguler l'homéostasie tissulaire et peut être médiée par des cellules phagocytaires non professionnelles, comme l'EPR qui réalise la phagocytose des SEP, les cellules souches neuronales de la zone subventriculaire du cerveau qui réalisent la phagocytose de certains neuroblastes nouvellement produits, et les cellules de Sertoli qui assurent l'élimination des

cellules spermatogéniques générées lors de la spermatogenèse (Ginisty et al., 2015; Lu et al., 1999). Les récepteurs TAM sont également impliqués dans la réduction de l'inflammation lors de la clairance des cellules apoptotiques mais aussi lors de la présence d'agents pathogènes (Lu and Lemke, 2001; Scott et al., 2001).

Les récepteurs TAM sont activés grâce à leurs ligands Gas6 et Protéine S. L'étude du mode de liaison de ces deux ligands sur MerTK, ainsi que les acides aminés impliqués pourraient permettre de mieux comprendre leurs rôles sur l'activité de MerTK et en parallèle sur les autres membres de la famille Tyro3 et Axl. En effet le rôle de Gas6 dans l'activation des récepteurs TAM est très peu étudié par rapport à Protéine S, comme dans la clairance des cellules apoptotiques par les macrophages, processus pour lequel le rôle potentiel de Gas6 est encore à identifier. Nous avons montré pour la première fois que ces deux ligands pourraient avoir un rôle différent sur MerTK, non pas sur l'activité de ce récepteur mais sur son clivage, permettant ainsi de réguler son activité (Law et al., 2015). Dans le plasma, la concentration de Gas6 est beaucoup moins importante que celle de Protéine S et il est entièrement lié à sAxl, suggérant que Gas6 est ainsi inhibé et incapable de lier et d'activer MerTK ou Tyro3 (Ekman et al., 2010). Cependant, comme nous l'avons montré certaines cellules comme l'EPR ou les photorécepteurs produisent elle-même les ligands dont elles ont besoin, engendrant des concentrations locales spécifiques pour certaines fonctions. Les souris déficientes soit pour Gas6 soit pour Protéine S ne développent pas de phénotype rétinien comme c'est le cas en l'absence de MerTK ou de tous les récepteurs TAM, montrant que la perte d'un des ligands est compensée par l'autre (Burstyn-Cohen et al., 2012; Prasad et al., 2006). Ces données suggèrent que Gas6 n'est pas essentiel à des récepteurs TAM, et que la perte de Gas6 peut être compensée par Protéine S qui permet la formation de dimères et l'activation des récepteurs.

Récemment la recherche clinique s'est particulièrement intéressée à la signalisation aberrante des récepteurs TAM dans le développement de tumeurs. En effet, des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinases des récepteurs TAM et de nombreux anticorps inhibant la liaison des récepteurs TAM à leurs ligands sont en cours de développement dans la thérapie de certains cancers, comme les mélanomes cutanés à métastases, le cancer du poumon non à petites cellules et le cancer du sein (Lew et al., 2014; Schlegel et al., 2013; Ye et al., 2010). Ces stratégies sont également utilisées pour lutter contre certaines infections virales. En effet, la capside de certains virus, comme le virus Ebola, le virus de la dengue, le virus de la vaccine et le virus respiratoire syncytial, expose des PtdSer qui sont reconnus par les récepteurs TAM,

permettant ainsi au virus de se répliquer et de diminuer l'inflammation (Amara and Mercer, 2015; Shibata et al., 2014). Pour le développement de nouvelles molécules thérapeutiques, la caractérisation de la liaison de Gas6 et de Protéine S sur les récepteurs TAM est essentielle.

La fonction des récepteurs TAM est également régulée par le clivage de leur domaine extracellulaire, au moins pour MerTK et Axl. Une quantité élevée de sAxl dans le sang est considérée comme un marqueur dans de nombreuses et diverses pathologies humaines, comme l'anévrisme au niveau de l'aorte, des infections pulmonaires, la prééclampsie et l'obésité (Lew et al., 2014). Le lupus érythémateux systémique est une pathologie chronique auto-immune caractérisée par une augmentation de la production de sMerTK (Wu et al., 2011). Cette augmentation engendre des défauts dans la clairance des cellules apoptotiques qui sont sûrement à l'origine de la synthèse d'auto-anticorps. Les données obtenues au cours de mon Doctorat sur le clivage de MerTK dans l'EPR montrent qu'ADAM17 semble être la protéase principale impliquée dans la libération de sMerTK. Chez les macrophages, ADAM17 est également impliquée dans le clivage de MerTK suite à une stimulation au LPS (Thorp et al., 2011). Cependant, malgré l'inhibition d'ADAM17 dans ces deux tissus, le clivage de MerTK n'est pas complètement aboli, démontrant l'implication d'autres protéases. En effet, les protéines ADAM présentent un mécanisme d'action complexe qui peut varier en fonction de la stimulation cellulaire et du type de cellules. De plus, lors de la perte d'une ADAM, son action peut être compensée par une autre ADAM. Ainsi, la/des protéase/s responsable/s du clivage de MerTK représente/nt une/des cible/s thérapeutique/s potentielle/s pour lutter contre cette pathologie.

Chez l'Homme, des mutations de *MERTK* sont impliquées dans des dégénérescences rétiniennes. Plusieurs approches de thérapie génique ont été testées dans les rétines de rongeurs via des adénovirus, des AAV ou des lentivirus (Deng et al., 2012; Tschernutter et al., 2005; Vollrath et al., 2001). Les photorécepteurs sont préservés et la fonction rétinienne persiste au-delà de 12 mois après l'injection. En 2011, la phase I d'un essai clinique a été initiée en Arabie Saoudite sur 6 patients atteints de dégénérescence rétinienne dues à des mutations de *MERTK* (clinicaltrials.gov; NCT01482195).



# BIBLIOGRAPHIE

- Adamis, A. P., Shima, D. T., Yeo, K. T., Yeo, T. K., Brown, L. F., Berse, B., D'Amore, P. A. and Folkman, J.** (1993). Synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 631–638.
- Akakura, S., Singh, S., Spataro, M., Akakura, R., Kim, J.-I., Albert, M. L. and Birge, R. B.** (2004). The opsonin MFG-E8 is a ligand for the  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin and triggers DOCK180-dependent Rac1 activation for the phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* **292**, 403–416.
- Amara, A. and Mercer, J.** (2015). Viral apoptotic mimicry. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 461–469.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. and Fahrenholz, F.** (2001). Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *FASEB J.* **15**, 1837–1839.
- Anderson, D. H., Fisher, S. K., Erickson, P. A. and Tabor, G. A.** (1980). Rod and cone disc shedding in the rhesus monkey retina: A quantitative study. *Experimental Eye Research* **30**, 559–574.
- Anderson, D. H., Johnson, L. V. and Hageman, G. S.** (1995). Vitronectin receptor expression and distribution at the photoreceptor-retinal pigment epithelial interface. *J. Comp. Neurol.* **360**, 1–16.
- Anderson, H. A., Maylock, C. A., Williams, J. A., Paweletz, C. P., Shu, H. and Shacter, E.** (2003). Serum-derived protein S binds to phosphatidylserine and stimulates the phagocytosis of apoptotic cells. *Nat. Immunol.* **4**, 87–91.
- Angelillo-Scherrer, A., Burnier, L., Flores, N., Savi, P., DeMol, M., Schaeffer, P., Herbert, J.-M., Lemke, G., Goff, S. P., Matsushima, G. K., et al.** (2005). Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *J. Clin. Invest.* **115**, 237–246.
- Aoki, N., Ishii, T., Ohira, S., Yamaguchi, Y., Negi, M., Adachi, T., Nakamura, R. and Matsuda, T.** (1997). Stage specific expression of milk fat globule membrane glycoproteins in mouse mammary gland: comparison of MFG-E8, butyrophilin, and CD36 with a major milk protein, beta-casein. *Biochim. Biophys. Acta* **1334**, 182–190.
- Arancibia, S. A., Beltrán, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F. and Hermoso, M. A.** (2007). Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol. Res.* **40**, 97–112.
- Aziz, M., Jacob, A., Matsuda, A. and Wang, P.** (2011). Review: milk fat globule-EGF factor 8 expression, function and plausible signal transduction in resolving inflammation. *Apoptosis* **16**, 1077–1086.
- Aziz, M., Yang, W.-L., Corbo, L. M., Chung, W. W., Matsuo, S. and Wang, P.** (2015). MFG-E8 inhibits neutrophil migration through  $\alpha$ v $\beta$ 3-integrin-dependent MAP kinase activation. *Int. J. Mol. Med.* **36**, 18–28.
- Baehr, W., Wu, S. M., Bird, A. C. and Palczewski, K.** (2003). The retinoid cycle and retina disease. *Vision Research* **43**, 2957–2958.
- Basinger, S., Hoffman, R. and Matthes, M.** (1976). Photoreceptor shedding is initiated by light in the frog retina. *Science* **194**, 1074–1076.
- Bax, D. V., Messent, A. J., Tart, J., van Hoang, M., Kott, J., Maciewicz, R. A. and Humphries, M. J.** (2004). Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 and ADAM-17 Interact in Vitro and Co-localize in Migrating HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 22377–22386.
- Beatty, S., Boulton, M., Henson, D., Koh, H. H. and Murray, I. J.** (1999). Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* **83**, 867–877.

- BEATTY, S., BOULTON, M., HENSON, D., KOH, H. and MURRAY, I.** (1999). Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* **83**, 867–877.
- Beatty, S., Koh, H.-H., Phil, M., Henson, D. and Boulton, M.** (2000). The Role of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Age-Related Macular Degeneration. *Survey of Ophthalmology* **45**, 115–134.
- Benzakour, O. and Kanthou, C.** (2000). The anticoagulant factor, protein S, is produced by cultured human vascular smooth muscle cells and its expression is up-regulated by thrombin. *Blood* **95**, 2008–2014.
- Benzakour, O., Gely, A., Lara, R. and Coronas, V.** (2007). [Gas-6 and protein S: vitamin K-dependent factors and ligands for the TAM tyrosine kinase receptors family]. *Med Sci (Paris)* **23**, 826–833.
- Berche, P.** (2003). [Bacterial aggression]. *Ann Pharm Fr* **61**, 270–275.
- Bhutto, I. and Luty, G.** (2012). Understanding age-related macular degeneration (AMD): Relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med* **33**, 295–317.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al.** (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* **385**, 729–733.
- Bok, D. and Hall, M. O.** (1971). The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J. Cell Biol.* **49**, 664–682.
- Bouck, N.** (2002). PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* **8**, 330–334.
- Boulton, M. and Dayhaw-Barker, P.** (2001). The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye* **15**, 384–389.
- Bourne, M. C., Campbell, D. A. and Tansley, K.** (1938). HEREDITARY DEGENERATION OF THE RAT RETINA. *Br J Ophthalmol* **22**, 613–623.
- Bowmaker, J. K. and Dartnall, H. J.** (1980). Visual pigments of rods and cones in a human retina. *J Physiol* **298**, 501–511.
- Brown, G. C. and Neher, J. J.** (2012). Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: “phagoptosis.” *Trends in Biochemical Sciences* **37**, 325–332.
- Budagian, V., Bulanova, E., Orinska, Z., Duitman, E., Brandt, K., Ludwig, A., Hartmann, D., Lemke, G., Saftig, P. and Bulfone-Paus, S.** (2005). Soluble Axl is generated by ADAM10-dependent cleavage and associates with Gas6 in mouse serum. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 9324–9339.
- Bullock, A., Duan, W. and Finnemann, S. C.** (2013). PI 3-kinase independent role for AKT in F-actin regulation during outer segment phagocytosis by RPE cells. *Exp. Eye Res.* **113**, 9–18.
- Burgess, B. L., Abrams, T. A., Nagata, S. and Hall, M. O.** (2006). MFG-E8 in the retina and retinal pigment epithelium of rat and mouse. *Mol. Vis.* **12**, 1437–1447.
- Burnside, M. B.** (1976). Possible roles of microtubules and actin filaments in retinal pigmented epithelium. *Exp. Eye Res.* **23**, 257–275.
- Burstyn-Cohen, T., Heeb, M. J. and Lemke, G.** (2009). Lack of protein S in mice causes embryonic lethal coagulopathy and vascular dysgenesis. *J. Clin. Invest.* **119**, 2942–2953.
- Burstyn-Cohen, T., Lew, E. D., Través, P. G., Burrola, P. G., Hash, J. C. and Lemke, G.** (2012). Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron* **76**, 1123–1132.
- Buxbaum, J. D., Liu, K. N., Luo, Y., Slack, J. L., Stocking, K. L., Peschon, J. J., Johnson, R. S., Castner, B. J., Cerretti, D. P. and Black, R. A.** (1998). Evidence that tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme is involved in regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J. Biol. Chem.* **273**, 27765–27767.

- Camenisch, T. D., Koller, B. H., Earp, H. S. and Matsushima, G. K.** (1999). A novel receptor tyrosine kinase, Mer, inhibits TNF- $\alpha$  production and lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *J. Immunol.* **162**, 3498–3503.
- Cao, Y., Kang, Q., Zhao, Z. and Zolkiewska, A.** (2002). Intracellular processing of metalloprotease disintegrin ADAM12. *J. Biol. Chem.* **277**, 26403–26411.
- Caolo, V., Swennen, G., Chalaris, A., Wagenaar, A., Verbruggen, S., Rose-John, S., Molin, D. G. M., Vooijs, M. and Post, M. J.** (2015). ADAM10 and ADAM17 have opposite roles during sprouting angiogenesis. *Angiogenesis* **18**, 13–22.
- Carter-Dawson, L. D. and LaVail, M. M.** (1979). Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *J. Comp. Neurol.* **188**, 245–262.
- Chen, J., Carey, K. and Godowski, P. J.** (1997). Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* **14**, 2033–2039.
- Cherepanoff, S., McMenamin, P., Gillies, M. C., Kettle, E. and Sarks, S. H.** (2010). Bruch's membrane and choroidal macrophages in early and advanced age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* **94**, 918–925.
- Cissé, M. A., Sunyach, C., Lefranc-Jullien, S., Postina, R., Vincent, B. and Checler, F.** (2005). The Disintegrin ADAM9 Indirectly Contributes to the Physiological Processing of Cellular Prion by Modulating ADAM10 Activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 40624–40631.
- Conlon, T. J., Deng, W.-T., Erger, K., Cossette, T., Pang, J., Ryals, R., Clément, N., Cleaver, B., McDoom, I., Boye, S. E., et al.** (2013). Preclinical potency and safety studies of an AAV2-mediated gene therapy vector for the treatment of MERTK associated retinitis pigmentosa. *Hum Gene Ther Clin Dev* **24**, 23–28.
- Costa, M., Bellosta, P. and Basilico, C.** (1996). Cleavage and release of a soluble form of the receptor tyrosine kinase ARK in vitro and in vivo. *J. Cell. Physiol.* **168**, 737–744.
- Cuenca, N., Fernández-Sánchez, L., Campello, L., Maneu, V., De la Villa, P., Lax, P. and Pinilla, I.** (2014). Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Prog Retin Eye Res* **43**, 17–75.
- Cunha-Vaz, J., Bernardes, R. and Lobo, C.** (2011). Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol* **21** Suppl 6, S3–9.
- Curcio, C. A., Sloan, K. R., Kalina, R. E. and Hendrickson, A. E.** (1990). Human photoreceptor topography. *J. Comp. Neurol.* **292**, 497–523.
- Dahlbäck, B.** (1986). Inhibition of protein C cofactor function of human and bovine protein S by C4b-binding protein. *J. Biol. Chem.* **261**, 12022–12027.
- Dahlbäck, B.** (2007). The tale of protein S and C4b-binding protein, a story of affection. *Thromb. Haemost.* **98**, 90–96.
- Dahlbäck, B. and Stenflo, J.** (1981). High molecular weight complex in human plasma between vitamin K-dependent protein S and complement component C4b-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2512–2516.
- Dallas, D. J., Genever, P. G., Patton, A. J., Millichip, M. I., McKie, N. and Skerry, T. M.** (1999). Localization of ADAM10 and Notch receptors in bone. *Bone* **25**, 9–15.
- D'Cruz, P. M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M. T., Abderrahim, H., LaVail, M. M. and Vollrath, D.** (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene MERTK in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 645–651.
- Delori, F. C., Fleckner, M. R., Goger, D. G., Weiter, J. J. and Dorey, C. K.** (2000). Autofluorescence distribution associated with drusen in age-related macular degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 496–504.

- Deng, T., Zhang, Y., Chen, Q., Yan, K. and Han, D.** (2012). Toll-like receptor-mediated inhibition of Gas6 and ProS expression facilitates inflammatory cytokine production in mouse macrophages. *Immunology* **135**, 40–50.
- Deschamps, C., Echard, A. and Niedergang, F.** (2013). Phagocytosis and cytokinesis: do cells use common tools to cut and to eat? Highlights on common themes and differences. *Traffic* **14**, 355–364.
- DeWan, A., Liu, M., Hartman, S., Zhang, S. S.-M., Liu, D. T. L., Zhao, C., Tam, P. O. S., Chan, W. M., Lam, D. S. C., Snyder, M., et al.** (2006). HTRA1 Promoter Polymorphism in Wet Age-Related Macular Degeneration. *Science* **314**, 989–992.
- Di Scipio, R. G., Hermodson, M. A., Yates, S. G. and Davie, E. W.** (1977). A comparison of human prothrombin, factor IX (Christmas factor), factor X (Stuart factor), and protein S. *Biochemistry* **16**, 698–706.
- Dowling, J. E. and Sidman, R. L.** (1962). Inherited retinal dystrophy in the rat. *J. Cell Biol.* **14**, 73–109.
- Dransfield, I., Zagórska, A., Lew, E. D., Michail, K. and Lemke, G.** (2015). Mer receptor tyrosine kinase mediates both tethering and phagocytosis of apoptotic cells. *Cell Death Dis* **6**, e1646.
- Dreymueller, D., Uhlig, S. and Ludwig, A.** (2015). ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **308**, L325–343.
- Duffy, M. J., McKiernan, E., O'Donovan, N. and McGowan, P. M.** (2009). Role of ADAMs in Cancer Formation and Progression. *Clin Cancer Res* **15**, 1140–1144.
- Duffy, M. J., Mullooly, M., O'Donovan, N., Sukor, S., Crown, J., Pierce, A. and McGowan, P. M.** (2011). The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteomics* **8**, 9.
- Duncan, K. G., Bailey, K. R., Kane, J. P. and Schwartz, D. M.** (2002). Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **292**, 1017–1022.
- Duncan, J. L., LaVail, M. M., Yasumura, D., Matthes, M. T., Yang, H., Trautmann, N., Chappelow, A. V., Feng, W., Earp, H. S., Matsushima, G. K., et al.** (2003). An RCS-like retinal dystrophy phenotype in mer knockout mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 826–838.
- Edwards, D. R., Handsley, M. M. and Pennington, C. J.** (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol. Aspects Med.* **29**, 258–289.
- Ekman, C., Stenhoff, J. and Dahlbäck, B.** (2010). Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *J. Thromb. Haemost.* **8**, 838–844.
- El-Haig, W. M., Jakobsson, C., Favez, T., Schorderet, D. F. and Abouzeid, H.** (2014). Novel ADAM9 homozygous mutation in a consanguineous Egyptian family with severe cone-rod dystrophy and cataract. *Br J Ophthalmol* **98**, 1718–1723.
- Elnér, V. M., Elnér, S. G., Bian, Z. M., Kindezelskii, A. L., Yoshida, A. and Petty, H. R.** (2003). RPE CD14 immunohistochemical, genetic, and functional expression. *Exp. Eye Res.* **76**, 321–331.
- Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H.-Z., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X.-P., Sheppard, D., Engvall, E. and Takada, Y.** (2002). Functional Classification of ADAMs Based on a Conserved Motif for Binding to Integrin  $\alpha 9 \beta 1$  IMPLICATIONS FOR SPERM-EGG BINDING AND OTHER CELL INTERACTIONS. *J. Biol. Chem.* **277**, 17804–17810.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. and Henson, P. M.** (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207–2216.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Frasch, S. C., Warner, M. L. and Henson, P. M.** (1998). The role of

- phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* **5**, 551–562.
- Fair, D. S. and Marlar, R. A.** (1986). Biosynthesis and secretion of factor VII, protein C, protein S, and the Protein C inhibitor from a human hepatoma cell line. *Blood* **67**, 64–70.
- Farkas, M. H., Lew, D. S., Sousa, M. E., Bujakowska, K., Chatagnon, J., Bhattacharya, S. S., Pierce, E. A. and Nandrot, E. F.** (2014). Mutations in pre-mRNA processing factors 3, 8, and 31 cause dysfunction of the retinal pigment epithelium. *Am. J. Pathol.* **184**, 2641–2652.
- Feng, W., Yasumura, D., Matthes, M. T., LaVail, M. M. and Vollrath, D.** (2002). Mertk triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 17016–17022.
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F. S. and Parmeggiani, F.** (2011). Retinitis Pigmentosa: Genes and Disease Mechanisms. *Curr Genomics* **12**, 238–249.
- Finnemann, S. C.** (2003). Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* **22**, 4143–4154.
- Finnemann, S. C. and Rodriguez-Boulan, E.** (1999). Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  integrins, and protein kinase C regulates  $\alpha v \beta 5$  binding and cytoskeletal linkage. *J. Exp. Med.* **190**, 861–874.
- Finnemann, S. C. and Silverstein, R. L.** (2001). Differential Roles of CD36 and  $\alpha v \beta 5$  Integrin in Photoreceptor Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium. *J Exp Med* **194**, 1289–1298.
- Finnemann, S. C., Bonilha, V. L., Marmorstein, A. D. and Rodriguez-Boulan, E.** (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires  $\alpha(v)\beta 5$  integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 12932–12937.
- Finnemann, S. C., Leung, L. W. and Rodriguez-Boulan, E.** (2002). The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 3842–3847.
- Fisher, S. K., Pfeffer, B. A. and Anderson, D. H.** (1983). Both rod and cone disc shedding are related to light onset in the cat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**, 844–856.
- Franeau, S., Monvoisin, A., Clarhaut, J., Talbot, J., Simonneau, C., Kanthou, C., Kanse, S. M., Philippe, M. and Benzakour, O.** (2012). The vitamin K-dependent anticoagulant factor, protein S, inhibits multiple VEGF-A-induced angiogenesis events in a Mer- and SHP2-dependent manner. *Blood* **120**, 5073–5083.
- Fu, Y.** (1995). Phototransduction in Rods and Cones. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (ed. Kolb, H.), Fernandez, E.), and Nelson, R.), Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Furie, B., Bouchard, B. A. and Furie, B. C.** (1999). Vitamin K-Dependent Biosynthesis of  $\gamma$ -Carboxyglutamic Acid. *Blood* **93**, 1798–1808.
- Gal, A., Li, Y., Thompson, D. A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S. G., Apfelstedt-Sylla, E. and Vollrath, D.** (2000). Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* **26**, 270–271.
- Gallicchio, M., Mitola, S., Valdembri, D., Fantozzi, R., Varnum, B., Avanzi, G. C. and Bussolino, F.** (2005). Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated endothelial cell activation by Axl tyrosine kinase receptor. *Blood* **105**, 1970–1976.
- Gely-Pernot, A., Coronas, V., Harnois, T., Prestoz, L., Mandairon, N., Didier, A., Berjeaud, J. M., Monvoisin, A., Bourmeyster, N., De Frutos, P. G., et al.** (2012). An endogenous vitamin K-dependent mechanism regulates cell proliferation in the brain subventricular stem cell niche. *Stem Cells* **30**, 719–731.
- Gibbs, D., Kitamoto, J. and Williams, D. S.** (2003). Abnormal phagocytosis by retinal pigmented

- epithelium that lacks myosin VIIa, the Usher syndrome 1B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6481–6486.
- Gilpin, B. J., Loechel, F., Mattei, M.-G., Engvall, E., Albrechtsen, R. and Wewer, U. M.** (1998). A Novel, Secreted Form of Human ADAM 12 (Meltrin  $\alpha$ ) Provokes Myogenesis in Vivo. *J. Biol. Chem.* **273**, 157–166.
- Ginisty, A., Gély-Pernot, A., Abaamrane, L., Morel, F., Arnault, P., Coronas, V. and Benzakour, O.** (2015). Evidence for a subventricular zone neural stem cell phagocytic activity stimulated by the vitamin K-dependent factor protein S. *Stem Cells* **33**, 515–525.
- Godowski, P. J., Mark, M. R., Chen, J., Sadick, M. D., Raab, H. and Hammonds, R. G.** (1995). Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro 3. *Cell* **82**, 355–358.
- Goldman, A. I. and O'Brien, P. J.** (1978). Phagocytosis in the retinal pigment epithelium of the RCS rat. *Science* **201**, 1023–1025.
- Goldstein, O., Mezey, J. G., Boyko, A. R., Gao, C., Wang, W., Bustamante, C. D., Anguish, L. J., Jordan, J. A., Pearce-Kelling, S. E., Aguirre, G. D., et al.** (2010). An ADAM9 mutation in canine cone-rod dystrophy 3 establishes homology with human cone-rod dystrophy 9. *Mol. Vis.* **16**, 1549–1569.
- Gonzales, P. E., Solomon, A., Miller, A. B., Leesnitzer, M. A., Sagi, I. and Milla, M. E.** (2004). Inhibition of the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -converting Enzyme by Its Pro Domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 31638–31645.
- Gooz, M.** (2010). ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **45**, 146–169.
- Graham, D. K., Dawson, T. L., Mullaney, D. L., Snodgrass, H. R. and Earp, H. S.** (1994). Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer [published erratum appears in *Cell Growth Differ* 1994 Sep;5(9):1022]. *Cell Growth & Differentiation* **5**, 647.
- Graziotto, J. J., Farkas, M. H., Bujakowska, K., Deramautd, B. M., Zhang, Q., Nandrot, E. F., Inglehearn, C. F., Bhattacharya, S. S. and Pierce, E. A.** (2011). Three gene-targeted mouse models of RNA splicing factor RP show late-onset RPE and retinal degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **52**, 190–198.
- Greenberg, M. E., Sun, M., Zhang, R., Febbraio, M., Silverstein, R. and Hazen, S. L.** (2006). Oxidized phosphatidylserine-CD36 interactions play an essential role in macrophage-dependent phagocytosis of apoptotic cells. *J Exp Med* **203**, 2613–2625.
- Griffin, J. H., Gruber, A. and Fernández, J. A.** (1992). Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood* **79**, 3203–3211.
- Gu, S. M., Thompson, D. A., Srikumari, C. R., Lorenz, B., Finckh, U., Nicoletti, A., Murthy, K. R., Rathmann, M., Kumaramanickavel, G., Denton, M. J., et al.** (1997). Mutations in RPE65 cause autosomal recessive childhood-onset severe retinal dystrophy. *Nat. Genet.* **17**, 194–197.
- Hafizi, S. and Dahlbäck, B.** (2006). Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *FEBS J.* **273**, 5231–5244.
- Hall, M. O., Prieto, A. L., Obin, M. S., Abrams, T. A., Burgess, B. L., Heeb, M. J. and Agnew, B. J.** (2001). Outer segment phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells requires Gas6. *Exp. Eye Res.* **73**, 509–520.
- Hall, M. O., Obin, M. S., Prieto, A. L., Burgess, B. L. and Abrams, T. A.** (2002). Gas6 binding to photoreceptor outer segments requires gamma-carboxyglutamic acid (Gla) and Ca(2+) and is required for OS phagocytosis by RPE cells in vitro. *Exp. Eye Res.* **75**, 391–400.
- Hall, M. O., Obin, M. S., Heeb, M. J., Burgess, B. L. and Abrams, T. A.** (2005). Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp.*

*Eye Res.* **81**, 581–591.

- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. and Nagata, S.** (2002). Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182–187.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y. and Nagata, S.** (2004). Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* **304**, 1147–1150.
- Hartmann, D., Strooper, B. de, Serneels, L., Craessaerts, K., Herreman, A., Annaert, W., Umans, L., Lübke, T., Illert, A. L., Figura, K. von, et al.** (2002). The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for  $\alpha$ -secretase activity in fibroblasts. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 2615–2624.
- Hassemer, E. L., Le Gall, S. M., Liegel, R., McNally, M., Chang, B., Zeiss, C. J., Dubielzig, R. D., Horiuchi, K., Kimura, T., Okada, Y., et al.** (2010). The waved with open eyelids (woe) locus is a hypomorphic mouse mutation in Adam17. *Genetics* **185**, 245–255.
- Henson, P. M., Bratton, D. L. and Fadok, V. A.** (2001). Apoptotic cell removal. *Current Biology* **11**, R795–R805.
- Hikita, A., Tanaka, N., Yamane, S., Ikeda, Y., Furukawa, H., Tohma, S., Suzuki, R., Tanaka, S., Mitomi, H. and Fukui, N.** (2009). Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Biochem. Cell Biol.* **87**, 581–593.
- Hollander, A. I. den, Roepman, R., Koenekoop, R. K. and Cremers, F. P. M.** (2008). Leber congenital amaurosis: genes, proteins and disease mechanisms. *Prog Retin Eye Res* **27**, 391–419.
- Hotoda, N., Koike, H., Sasagawa, N. and Ishiura, S.** (2002). A secreted form of human ADAM9 has an  $\alpha$ -secretase activity for APP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**, 800–805.
- Hougaard, S., Loechel, F., Xu, X., Tajima, R., Albrechtsen, R. and Wewer, U. M.** (2000). Trafficking of human ADAM 12-L: retention in the trans-Golgi network. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 261–267.
- Howard, L., Maciewicz, R. A. and Blobel, C. P.** (2000). Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem J* **348**, 21–27.
- Huchtagowder, V., Meyer, R., Mullins, C., Nagarajan, R., DiPersio, J. F., Vij, R., Tomasson, M. H. and Kulkarni, S.** (2012). Resequencing analysis of the candidate tyrosine kinase and RAS pathway gene families in multiple myeloma. *Cancer Genet* **205**, 474–478.
- Hull, S., Arno, G., Plagnol, V., Robson, A., Webster, A. R. and Moore, A. T.** (2015). Exome sequencing reveals ADAM9 mutations in a child with cone-rod dystrophy. *Acta Ophthalmol* **93**, e392–393.
- Hurtado, B., Muñoz, X., Recarte-Pelz, P., García, N., Luque, A., Krupinski, J., Sala, N. and García de Frutos, P.** (2011). Expression of the vitamin K-dependent proteins GAS6 and protein S and the TAM receptor tyrosine kinases in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb. Haemost.* **105**, 873–882.
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S., et al.** (1998). A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *EMBO J.* **17**, 7260–7272.
- Jia, R., Mayer, B. J., Hanafusa, T. and Hanafusa, H.** (1992). A novel oncogene, v-ryk, encoding a truncated receptor tyrosine kinase is transduced into the RPL30 virus without loss of viral sequences. *J. Virol.* **66**, 5975–5987.
- Jiang, M., Esteve-Rudd, J., Lopes, V. S., Diemer, T., Lillo, C., Rump, A. and Williams, D. S.**

- (2015). Microtubule motors transport phagosomes in the RPE, and lack of KLC1 leads to AMD-like pathogenesis. *J. Cell Biol.* **210**, 595–611.
- Jin, M., Li, S., Nusinowitz, S., Lloyd, M., Hu, J., Radu, R. A., Bok, D. and Travis, G. H.** (2009). The Role of Interphotoreceptor Retinoid-Binding Protein on the Translocation of Visual Retinoids and Function of Cone Photoreceptors. *J Neurosci* **29**, 1486–1495.
- Jones, A., Kumar, S., Zhang, N., Tong, Z., Yang, J.-H., Watt, C., Anderson, J., Amrita, null, Fillerup, H., McCloskey, M., et al.** (2011). Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 14578–14583.
- Jones, A. V., Lambert, D. W., Speight, P. M. and Whawell, S. A.** (2013). ADAM 10 is over expressed in oral squamous cell carcinoma and contributes to invasive behaviour through a functional association with  $\alpha\beta 6$  integrin. *FEBS Lett.* **587**, 3529–3534.
- Kaplan, J., Perrault, I., Hanein, S., Dollfus, H. and Rozet, J.-M.** (2013). [Mutations in NMNAT1 cause Leber congenital amaurosis with severe macular and optic atrophy]. *Med Sci (Paris)* **29**, 26–27.
- Karl, M. O., Kroeger, W., Wimmers, S., Milenkovic, V. M., Valtink, M., Engelmann, K. and Strauss, O.** (2008). Endogenous Gas6 and  $\text{Ca}^{2+}$  -channel activation modulate phagocytosis by retinal pigment epithelium. *Cell. Signal.* **20**, 1159–1168.
- Katz, M. L. and Robison Jr, W. G.** (2002). What is lipofuscin? Defining characteristics and differentiation from other autofluorescent lysosomal storage bodies. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **34**, 169–184.
- Kevany, B. M. and Palczewski, K.** (2010). Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors. *Physiology (Bethesda)* **25**, 8–15.
- Klaassen, I., Van Noorden, C. J. F. and Schlingemann, R. O.** (2013). Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res* **34**, 19–48.
- Kleino, I., Ortiz, R. M., Yritys, M., Huovila, A.-P. J. and Saksela, K.** (2009). Alternative splicing of ADAM15 regulates its interactions with cellular SH3 proteins. *J. Cell. Biochem.* **108**, 877–885.
- Kobayashi, N., Karisola, P., Peña-Cruz, V., Dorfman, D. M., Jinushi, M., Umetsu, S. E., Butte, M. J., Nagumo, H., Chernova, I., Zhu, B., et al.** (2007). T cell Immunoglobulin Mucin Protein (TIM)-4 binds phosphatidylserine and mediates uptake of apoptotic cells. *Immunity* **27**, 927–940.
- Kolb, H.** (1995a). Simple Anatomy of the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (ed. Kolb, H.), Fernandez, E.), and Nelson, R.), Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Kolb, H.** (1995b). Photoreceptors. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System* (ed. Kolb, H.), Fernandez, E.), and Nelson, R.), Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Kolb, H.** (2003). How the Retina Works. *American Scientist* **91**, 28.
- Korshunov, V. A., Mohan, A. M., Georger, M. A. and Berk, B. C.** (2006). Axl, A Receptor Tyrosine Kinase, Mediates Flow-Induced Vascular Remodeling. *Circulation Research* **98**, 1446–1452.
- Laberge, M. A., Moore, K. J. and Freeman, M. W.** (2005). Atherosclerosis and innate immune signaling. *Ann. Med.* **37**, 130–140.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. and Fahrenholz, F.** (1999). Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *PNAS* **96**, 3922–3927.
- LaVail, M. M.** (1976). Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting.



- Science* **194**, 1071–1074.
- LaVail, M. M.** (1980). Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **19**, 407–411.
- Law, A.-L., Parinot, C., Chatagnon, J., Gravez, B., Sahel, J.-A., Bhattacharya, S. S. and Nandrot, E. F.** (2015). Cleavage of Mer tyrosine kinase (MerTK) from the cell surface contributes to the regulation of retinal phagocytosis. *J. Biol. Chem.* **290**, 4941–4952.
- Lemke, G.** (2013). Biology of the TAM Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a009076.
- Lemke, G. and Burstyn-Cohen, T.** (2010). TAM receptors and the clearance of apoptotic cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1209**, 23–29.
- Lemke, G. and Lu, Q.** (2003). Macrophage regulation by Tyro 3 family receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 31–36.
- Lemke, G. and Rothlin, C. V.** (2008). Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* **8**, 327–336.
- Lew, E. D., Oh, J., Burrola, P. G., Lax, I., Zagórska, A., Través, P. G., Schlessinger, J. and Lemke, G.** (2014). Differential TAM receptor–ligand–phospholipid interactions delimit differential TAM bioactivities. *eLife* **3**,.
- Liao, D., Wang, X., Li, M., Lin, P. H., Yao, Q. and Chen, C.** (2009). Human protein S inhibits the uptake of AcLDL and expression of SR-A through Mer receptor tyrosine kinase in human macrophages. *Blood* **113**, 165–174.
- Ling, L., Templeton, D. and Kung, H. J.** (1996). Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **271**, 18355–18362.
- Linger, R. M. A., Keating, A. K., Earp, H. S. and Graham, D. K.** (2008). TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv. Cancer Res.* **100**, 35–83.
- Linger, R. M. A., Lee-Sherick, A. B., DeRyckere, D., Cohen, R. A., Jacobsen, K. M., McGranahan, A., Brandão, L. N., Wings, A., Sawczyn, K. K., Liang, X., et al.** (2013). Mer receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **122**, 1599–1609.
- Loechel, F., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Albrechtsen, R. and Wewer, U. M.** (1999). Regulation of Human ADAM 12 Protease by the Prodomain EVIDENCE FOR A FUNCTIONAL CYSTEINE SWITCH. *J. Biol. Chem.* **274**, 13427–13433.
- Long, G. L., Lu, D., Xie, R.-L. and Kalafatis, M.** (1998). Human Protein S Cleavage and Inactivation by Coagulation Factor Xa. *J. Biol. Chem.* **273**, 11521–11526.
- Lu, Q. and Lemke, G.** (2001). Homeostatic Regulation of the Immune System by Receptor Tyrosine Kinases of the Tyro 3 Family. *Science* **293**, 306–311.
- Lu, Q., Gore, M., Zhang, Q., Camenisch, T., Boast, S., Casagrande, F., Lai, C., Skinner, M. K., Klein, R., Matsushima, G. K., et al.** (1999). Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* **398**, 723–728.
- Lum, L., Reid, M. S. and Blobel, C. P.** (1998). Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J. Biol. Chem.* **273**, 26236–26247.
- Manfioletti, G., Brancolini, C., Avanzi, G. and Schneider, C.** (1993). The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4976–4985.
- Mao, Y. and Finnemann, S. C.** (2012). Essential diurnal Rac1 activation during retinal phagocytosis requires  $\alpha\beta 5$  integrin but not tyrosine kinases focal adhesion kinase or Mer tyrosine kinase. *Mol Biol Cell* **23**, 1104–1114.

- Mao, Y. and Finnemann, S. C.** (2015). Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Small GTPases* 1–11.
- Mata, N. L., Radu, R. A., Clemmons, R. S. and Travis, G. H.** (2002). Isomerization and Oxidation of Vitamin A in Cone-Dominant Retinas. *Neuron* **36**, 69–80.
- Mayerson, P. L. and Hall, M. O.** (1986). Rat retinal pigment epithelial cells show specificity of phagocytosis in vitro. *J. Cell Biol.* **103**, 299–308.
- Melaragno, M. G., Fridell, Y. W. and Berk, B. C.** (1999). The Gas6/Axl system: a novel regulator of vascular cell function. *Trends Cardiovasc. Med.* **9**, 250–253.
- Miceli, M. V., Newsome, D. A. and Tate, D. J.** (1997). Vitronectin is responsible for serum-stimulated uptake of rod outer segments by cultured retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 1588–1597.
- Miksa, M., Amin, D., Wu, R., Jacob, A., Zhou, M., Dong, W., Yang, W.-L., Ravikumar, T. S. and Wang, P.** (2008). Maturation-induced down-regulation of MFG-E8 impairs apoptotic cell clearance and enhances endotoxin response. *Int. J. Mol. Med.* **22**, 743–748.
- Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T. and Nagata, S.** (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* **450**, 435–439.
- Moiseyev, G., Chen, Y., Takahashi, Y., Wu, B. X. and Ma, J.** (2005). RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *PNAS* **102**, 12413–12418.
- Morimura, H., Fishman, G. A., Grover, S. A., Fulton, A. B., Berson, E. L. and Dryja, T. P.** (1998). Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3088–3093.
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., et al.** (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* **385**, 733–736.
- Moss, M. L., Bomar, M., Liu, Q., Sage, H., Dempsey, P., Lenhart, P. M., Gillispie, P. A., Stoeck, A., Wildeboer, D., Bartsch, J. W., et al.** (2007). The ADAM10 prodomain is a specific inhibitor of ADAM10 proteolytic activity and inhibits cellular shedding events. *J. Biol. Chem.* **282**, 35712–35721.
- Moss, M. L., Powell, G., Miller, M. A., Edwards, L., Qi, B., Sang, Q.-X. A., De Strooper, B., Tesseur, I., Lichtenthaler, S. F., Taverna, M., et al.** (2011). ADAM9 inhibition increases membrane activity of ADAM10 and controls  $\alpha$ -secretase processing of amyloid precursor protein. *J. Biol. Chem.* **286**, 40443–40451.
- Nagata, K., Ohashi, K., Nakano, T., Arita, H., Zong, C., Hanafusa, H. and Mizuno, K.** (1996). Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 30022–30027.
- Nakano, T., Ishimoto, Y., Kishino, J., Umeda, M., Inoue, K., Nagata, K., Ohashi, K., Mizuno, K. and Arita, H.** (1997). Cell adhesion to phosphatidylserine mediated by a product of growth arrest-specific gene 6. *J. Biol. Chem.* **272**, 29411–29414.
- Nandrot, E., Dufour, E. M., Provost, A. C., Péquignot, M. O., Bonnel, S., Gogat, K., Marchant, D., Rouillac, C., Sépulchre de Condé, B., Bihoreau, M. T., et al.** (2000). Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol. Dis.* **7**, 586–599.
- Nandrot, E. F., Kim, Y., Brodie, S. E., Huang, X., Sheppard, D. and Finnemann, S. C.** (2004). Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin. *J. Exp. Med.* **200**, 1539–1545.
- Nandrot, E. F., Anand, M., Sircar, M. and Finnemann, S. C.** (2006). Novel role for  $\alpha$ v $\beta$ 5-integrin in retinal adhesion and its diurnal peak. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **290**, C1256–1262.

- Nandrot, E. F., Anand, M., Almeida, D., Atabai, K., Sheppard, D. and Finnemann, S. C.** (2007). Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 12005–12010.
- Nandrot, E. F., Silva, K. E., Scelfo, C. and Finnemann, S. C.** (2012). Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of  $\alpha v \beta 5$  integrin. *Biol. Cell* **104**, 326–341.
- Niedergang, F. and Chavrier, P.** (2004). Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 422–428.
- Niedergang, F. and Chavrier, P.** (2005). Regulation of phagocytosis by Rho GTPases. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **291**, 43–60.
- O'Bryan, J. P., Frye, R. A., Cogswell, P. C., Neubauer, A., Kitch, B., Prokop, C., Espinosa, R., Le Beau, M. M., Earp, H. S. and Liu, E. T.** (1991). axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5016–5031.
- O'Bryan, J. P., Fridell, Y.-W., Koski, R., Varnum, B. and Liu, E. T.** (1995). The Transforming Receptor Tyrosine Kinase, Axl, Is Post-translationally Regulated by Proteolytic Cleavage. *J. Biol. Chem.* **270**, 551–557.
- O'Day** (1978). Rhythmic daily shedding of outer-segment membranes by visual cells in the goldfish. *J Cell Biol* **76**, 593–604.
- Okada, A., Mochizuki, S., Yatabe, T., Kimura, T., Shiomi, T., Fujita, Y., Matsumoto, H., Sehara-Fujisawa, A., Iwamoto, Y. and Okada, Y.** (2008). ADAM-12 (meltrin  $\alpha$ ) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor binding protein 5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis & Rheumatism* **58**, 778–789.
- Oshima, K., Aoki, N., Negi, M., Kishi, M., Kitajima, K. and Matsuda, T.** (1999). Lactation-dependent expression of an mRNA splice variant with an exon for a multiply O-glycosylated domain of mouse milk fat globule glycoprotein MFG-E8. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **254**, 522–528.
- Oshima, K., Aoki, N., Kato, T., Kitajima, K. and Matsuda, T.** (2002). Secretion of a peripheral membrane protein, MFG-E8, as a complex with membrane vesicles. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1209–1218.
- Pan, D. and Rubin, G. M.** (1997). Kuzbanian Controls Proteolytic Processing of Notch and Mediates Lateral Inhibition during Drosophila and Vertebrate Neurogenesis. *Cell* **90**, 271–280.
- Panatala, R., Hennrich, H. and Holthuis, J. C. M.** (2015). Inner workings and biological impact of phospholipid flippases. *J Cell Sci* **128**, 2021–2032.
- Parinot, C., Rieu, Q., Chatagnon, J., Finnemann, S. C. and Nandrot, E. F.** (2014). Large-scale purification of porcine or bovine photoreceptor outer segments for phagocytosis assays on retinal pigment epithelial cells. *J Vis Exp*.
- Park, D., Tosello-Trampont, A.-C., Elliott, M. R., Lu, M., Haney, L. B., Ma, Z., Klibanov, A. L., Mandell, J. W. and Ravichandran, K. S.** (2007). BAI1 is an engulfment receptor for apoptotic cells upstream of the ELMO/Dock180/Rac module. *Nature* **450**, 430–434.
- Park, S.-Y., Jung, M.-Y., Kim, H.-J., Lee, S.-J., Kim, S.-Y., Lee, B.-H., Kwon, T.-H., Park, R.-W. and Kim, I.-S.** (2008). Rapid cell corpse clearance by stabilin-2, a membrane phosphatidylserine receptor. *Cell Death Differ.* **15**, 192–201.
- Parry, D. A., Toomes, C., Bida, L., Danciger, M., Towns, K. V., McKibbin, M., Jacobson, S. G., Logan, C. V., Ali, M., Bond, J., et al.** (2009). Loss of the metalloprotease ADAM9 leads to cone-rod dystrophy in humans and retinal degeneration in mice. *Am. J. Hum. Genet.* **84**, 683–691.
- Perry, V. H. and Gordon, S.** (1988). Macrophages and microglia in the nervous system. *Trends*

- Peschon, J. J., Slack, J. L., Reddy, P., Stocking, K. L., Sunnarborg, S. W., Lee, D. C., Russell, W. E., Castner, B. J., Johnson, R. S., Fitzner, J. N., et al.** (1998). An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* **282**, 1281–1284.
- Postina, R., Schroeder, A., Dewachter, I., Bohl, J., Schmitt, U., Kojro, E., Prinzen, C., Endres, K., Hiemke, C., Blessing, M., et al.** (2004). A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* **113**, 1456–1464.
- Pournaras, C. J., Rungger-Brändle, E., Riva, C. E., Hardarson, S. H. and Stefansson, E.** (2008). Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res* **27**, 284–330.
- Prasad, D., Rothlin, C. V., Burrola, P., Burstyn-Cohen, T., Lu, Q., Garcia de Frutos, P. and Lemke, G.** (2006). TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Mol. Cell. Neurosci.* **33**, 96–108.
- Primakoff, P. and Myles, D. G.** (2000). The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet.* **16**, 83–87.
- Provost, A. C., Péquignot, M. O., Sainton, K. M., Gadin, S., Sallé, S., Marchant, D., Hales, D. B. and Aitibol, M.** (2003). Expression of SR-BI receptor and StAR protein in rat ocular tissues. *C. R. Biol.* **326**, 841–851.
- Pruessmeyer, J. and Ludwig, A.** (2009). The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* **20**, 164–174.
- Rakoczy, P. E., Sarks, S. H., Daw, N. and Constable, I. J.** (1999). Distribution of cathepsin D in human eyes with or without age-related maculopathy. *Exp. Eye Res.* **69**, 367–374.
- Ravichandran, K. S.** (2011). Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* **35**, 445–455.
- Reddy, P., Slack, J. L., Davis, R., Cerretti, D. P., Kozlosky, C. J., Blanton, R. A., Shows, D., Peschon, J. J. and Black, R. A.** (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *J. Biol. Chem.* **275**, 14608–14614.
- Rieke, F. and Baylor, D. A.** (1998). Origin of reproducibility in the responses of retinal rods to single photons. *Biophys J* **75**, 1836–1857.
- Rodríguez de Córdoba, S., Pérez-Blas, M., Ramos-Ruiz, R., Sánchez-Corral, P., Pardo-Manuel de Villena, F. and Rey-Campos, J.** (1994). The gene coding for the beta-chain of C4b-binding protein (C4BPB) has become a pseudogene in the mouse. *Genomics* **21**, 501–509.
- Rothlin, C. V., Ghosh, S., Zuniga, E. I., Oldstone, M. B. A. and Lemke, G.** (2007). TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* **131**, 1124–1136.
- Ruggiero, L., Connor, M. P., Chen, J., Langen, R. and Finnemann, S. C.** (2012). Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not *Itgb5*<sup>-/-</sup> or *Mfge8*<sup>-/-</sup> mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 8145–8148.
- Ryeom, S. W., Sparrow, J. R. and Silverstein, R. L.** (1996a). CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J Cell Sci* **109**, 387–395.
- Ryeom, S. W., Silverstein, R. L., Scotto, A. and Sparrow, J. R.** (1996b). Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by the scavenger receptor CD36. *J. Biol. Chem.* **271**, 20536–20539.
- Sabroe, I., Parker, L. C., Dower, S. K. and Whyte, M. K. B.** (2008). The role of TLR activation in inflammation. *J. Pathol.* **214**, 126–135.
- Saller, F., Villoutreix, B. O., Amelot, A., Kaabache, T., Le Bonniec, B. F., Aiach, M., Gandrille, S. and Borgel, D.** (2005). The gamma-carboxyglutamic acid domain of anticoagulant protein S is

- involved in activated protein C cofactor activity, independently of phospholipid binding. *Blood* **105**, 122–130.
- Saller, F., Brisset, A. C., Tchaikovski, S. N., Azevedo, M., Chrast, R., Fernández, J. A., Schapira, M., Hackeng, T. M., Griffin, J. H. and Angelillo-Scherrer, A. (2009). Generation and phenotypic analysis of protein S-deficient mice. *Blood* **114**, 2307–2314.
- Sasaki, T., Knyazev, P. G., Clout, N. J., Cheburkin, Y., Göhring, W., Ullrich, A., Timpl, R. and Hohenester, E. (2006). Structural basis for Gas6-Axl signalling. *EMBO J.* **25**, 80–87.
- Sather, S., Kenyon, K. D., Lefkowitz, J. B., Liang, X., Varnum, B. C., Henson, P. M. and Graham, D. K. (2007). A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood* **109**, 1026–1033.
- Savill, J. and Fadok, V. (2000). Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 784–788.
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C. and Rose-John, S. (2011). ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* **32**, 380–387.
- Schlegel, J., Sambade, M. J., Sather, S., Moschos, S. J., Tan, A.-C., Winges, A., DeRyckere, D., Carson, C. C., Trembath, D. G., Tentler, J. J., et al. (2013). MERTK receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in melanoma. *J. Clin. Invest.* **123**, 2257–2267.
- Schlessinger, J. (2000). Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. *Cell* **103**, 211–225.
- Schlöndorff, J., Becherer, J. D. and Blobel, C. P. (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem. J.* **347 Pt 1**, 131–138.
- Scott, R. S., McMahon, E. J., Pop, S. M., Reap, E. A., Caricchio, R., Cohen, P. L., Earp, H. S. and Matsushima, G. K. (2001). Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* **411**, 207–211.
- Scott, C. C., Dobson, W., Botelho, R. J., Coady-Osberg, N., Chavrier, P., Knecht, D. A., Heath, C., Stahl, P. and Grinstein, S. (2005). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *J. Cell Biol.* **169**, 139–149.
- Seals, D. F. and Courtneidge, S. A. (2003). The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* **17**, 7–30.
- Seitz, H. M., Camenisch, T. D., Lemke, G., Earp, H. S. and Matsushima, G. K. (2007). Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *J. Immunol.* **178**, 5635–5642.
- Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S. J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., et al. (2013). CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol Med* **5**, 1775–1793.
- Shelby, S. J., Colwill, K., Dhe-Paganon, S., Pawson, T. and Thompson, D. A. (2013). MERTK interactions with SH2-domain proteins in the retinal pigment epithelium. *PLoS ONE* **8**, e53964.
- Shi, Z., Xu, W., Loechel, F., Wewer, U. M. and Murphy, L. J. (2000). ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J. Biol. Chem.* **275**, 18574–18580.
- Shibata, T., Habel, D. M., Coelho, A. L., Kunkel, S. L., Lukacs, N. W. and Hogaboam, C. M. (2014). Axl receptor blockade ameliorates pulmonary pathology resulting from primary viral infection and viral exacerbation of asthma. *J. Immunol.* **192**, 3569–3581.
- Shiomi, T., Lemaître, V., D’Armiento, J. and Okada, Y. (2010). Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol. Int.* **60**, 477–496.

- Shukla, M., Htoo, H. H., Wintachai, P., Hernandez, J.-F., Dubois, C., Postina, R., Xu, H., Checler, F., Smith, D. R., Govitrapong, P., et al.** (2015). Melatonin stimulates the nonamyloidogenic processing of  $\beta$ APP through the positive transcriptional regulation of ADAM10 and ADAM17. *J. Pineal Res.* **58**, 151–165.
- Slack, B. E., Ma, L. K. and Seah, C. C.** (2001). Constitutive shedding of the amyloid precursor protein ectodomain is up-regulated by tumour necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme. *Biochem. J.* **357**, 787–794.
- Soond, S. M., Everson, B., Riches, D. W. H. and Murphy, G.** (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF $\alpha$ -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J. Cell. Sci.* **118**, 2371–2380.
- Sparrow, J. R. and Boulton, M.** (2005). RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology. *Exp. Eye Res.* **80**, 595–606.
- Stamer, W. D., Bok, D., Hu, J., Jaffe, G. J. and McKay, B. S.** (2003). Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 2803–2808.
- Stitt, T. N., Conn, G., Goret, M., Lai, C., Bruno, J., Radzilewski, C., Mattsson, K., Fisher, J., Gies, D. R., Jones, P. F., et al.** (1995). The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* **80**, 661–670.
- Strauss, O.** (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* **85**, 845–881.
- Strick, D. J., Feng, W. and Vollrath, D.** (2009). MERTK drives myosin II redistribution during retinal pigment epithelial phagocytosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 2427–2435.
- Suleiman, L., N  grier, C. and Boukerche, H.** (2013). Protein S: A multifunctional anticoagulant vitamin K-dependent protein at the crossroads of coagulation, inflammation, angiogenesis, and cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 637–654.
- Sun, M., Finnemann, S. C., Febbraio, M., Shan, L., Annangudi, S. P., Podrez, E. A., Hoppe, G., Darrow, R., Organisciak, D. T., Salomon, R. G., et al.** (2006). Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *J. Biol. Chem.* **281**, 4222–4230.
- Sung, C.-H. and Chuang, J.-Z.** (2010). The cell biology of vision. *J Cell Biol* **190**, 953–963.
- Suttie, J. W.** (1980). The metabolic role of vitamin K. *Fed. Proc.* **39**, 2730–2735.
- Swanson, J. A.** (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 639–649.
- Takahashi, M. and Cooper, G. M.** (1987). ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 1378–1385.
- Tang, P. H., Wheless, L. and Crouch, R. K.** (2011a). Regeneration of photopigment is enhanced in mouse cone photoreceptors expressing RPE65 protein. *J. Neurosci.* **31**, 10403–10411.
- Tang, P. H., Buhusi, M. C., Ma, J.-X. and Crouch, R. K.** (2011b). RPE65 is present in human green/red cones and promotes photopigment regeneration in an in vitro cone cell model. *J. Neurosci.* **31**, 18618–18626.
- Tellier, E., Canault, M., Rebsomen, L., Bonardo, B., Juhan-Vague, I., Nalbone, G. and Peiretti, F.** (2006). The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp. Cell Res.* **312**, 3969–3980.
- Thorp, E., Vaisar, T., Subramanian, M., Mautner, L., Blobel, C. and Tabas, I.** (2011). Shedding of the Mer tyrosine kinase receptor is mediated by ADAM17 protein through a pathway involving reactive oxygen species, protein kinase C $\delta$ , and p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). *J. Biol. Chem.* **286**, 33335–33344.

- Tousseyn, T., Thathiah, A., Jorissen, E., Raemaekers, T., Konietzko, U., Reiss, K., Maes, E., Snellinx, A., Serneels, L., Nyabi, O., et al. (2009). ADAM10, the rate-limiting protease of regulated intramembrane proteolysis of Notch and other proteins, is processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the gamma-secretase. *J. Biol. Chem.* **284**, 11738–11747.
- Tschernutter, M., Schlichtenbrede, F. C., Howe, S., Balaggan, K. S., Munro, P. M., Bainbridge, J. W. B., Thrasher, A. J., Smith, A. J. and Ali, R. R. (2005). Long-term preservation of retinal function in the RCS rat model of retinitis pigmentosa following lentivirus-mediated gene therapy. *Gene Ther.* **12**, 694–701.
- Tschernutter, M., Jenkins, S. A., Waseem, N. H., Saihan, Z., Holder, G. E., Bird, A. C., Bhattacharya, S. S., Ali, R. R. and Webster, A. R. (2006). Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the Mertk gene. *Br J Ophthalmol* **90**, 718–723.
- Tworkoski, K. A., Platt, J. T., Bacchiocchi, A., Bosenberg, M., Boggon, T. J. and Stern, D. F. (2013). MERTK controls melanoma cell migration and survival and differentially regulates cell behavior relative to AXL. *Pigment Cell Melanoma Res* **26**, 527–541.
- Uehara, H. and Shacter, E. (2008). Auto-oxidation and oligomerization of protein S on the apoptotic cell surface is required for Mer tyrosine kinase-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J. Immunol.* **180**, 2522–2530.
- van der Meer, J. H. M., van der Poll, T. and van 't Veer, C. (2014). TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood* **123**, 2460–2469.
- Varnum, B. C., Young, C., Elliott, G., Garcia, A., Bartley, T. D., Fridell, Y. W., Hunt, R. W., Trail, G., Clogston, C. and Toso, R. J. (1995). Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* **373**, 623–626.
- Vieira, O. V., Botelho, R. J., Rameh, L., Brachmann, S. M., Matsuo, T., Davidson, H. W., Schreiber, A., Backer, J. M., Cantley, L. C. and Grinstein, S. (2001). Distinct roles of class I and class III phosphatidylinositol 3-kinases in phagosome formation and maturation. *J Cell Biol* **155**, 19–26.
- Vierkotten, S., Muether, P. S. and Fauser, S. (2011). Overexpression of HTRA1 Leads to Ultrastructural Changes in the Elastic Layer of Bruch's Membrane via Cleavage of Extracellular Matrix Components. *PLoS One* **6**.
- Vives-Bauza, C., Anand, M., Shiraz, A. K., Shirazi, A. K., Magrane, J., Gao, J., Vollmer-Snarr, H. R., Manfredi, G. and Finnemann, S. C. (2008). The age lipid A2E and mitochondrial dysfunction synergistically impair phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 24770–24780.
- Vollrath, D., Feng, W., Duncan, J. L., Yasumura, D., D'Cruz, P. M., Chappelow, A., Matthes, M. T., Kay, M. A. and LaVail, M. M. (2001). Correction of the retinal dystrophy phenotype of the RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 12584–12589.
- Walker, F. J. (1980). Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S. *J. Biol. Chem.* **255**, 5521–5524.
- Walker, F. J. (1984). Protein S and the regulation of activated protein C. *Semin. Thromb. Hemost.* **10**, 131–138.
- Wallin, R. and Hutson, S. M. (2004). Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med* **10**, 299–302.
- Watanabe, T., Kobunai, T., Yamamoto, Y., Matsuda, K., Ishihara, S., Nozawa, K., Iinuma, H., Ikeuchi, H. and Eshima, K. (2011). Differential gene expression signatures between colorectal cancers with and without KRAS mutations: crosstalk between the KRAS pathway and other signalling pathways. *Eur. J. Cancer* **47**, 1946–1954.
- Watkins, P. C., Eddy, R., Fukushima, Y., Byers, M. G., Cohen, E. H., Dackowski, W. R., Wydro, R. M. and Shows, T. B. (1988). The gene for protein S maps near the centromere of human

- chromosome 3. *Blood* **71**, 238–241.
- Weier, H. U., Fung, J. and Lersch, R. A.** (1999). Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to human chromosome 2q14.1 by in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **84**, 91–92.
- Weil, D., Blanchard, S., Kaplan, J., Guilford, P., Gibson, F., Walsh, J., Mburu, P., Varela, A., Levilliers, J. and Weston, M. D.** (1995). Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* **374**, 60–61.
- Weinger, J. G., Omari, K. M., Marsden, K., Raine, C. S. and Shafit-Zagardo, B.** (2009). Up-regulation of soluble Axl and Mer receptor tyrosine kinases negatively correlates with Gas6 in established multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* **175**, 283–293.
- Weskamp, G., Cai, H., Brodie, T. A., Higashiyama, S., Manova, K., Ludwig, T. and Blobel, C. P.** (2002). Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1537–1544.
- Williams, D. S. and Lopes, V.** (2011). The many different cellular functions of MYO7A in the retina. *Biochem Soc Trans* **39**, 1207–1210.
- Winkler, B. S.** (2008). An hypothesis to account for the renewal of outer segments in rod and cone photoreceptor cells: renewal as a surrogate antioxidant. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 3259–3261.
- Witmer, A. N., Vrensen, G. F. J. M., Van Noorden, C. J. F. and Schlingemann, R. O.** (2003). Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* **22**, 1–29.
- Wu, Y., Singh, S., Georgescu, M.-M. and Birge, R. B.** (2005). A role for Mer tyrosine kinase in  $\alpha\beta 5$  integrin-mediated phagocytosis of apoptotic cells. *J Cell Sci* **118**, 539–553.
- Wu, J., Ekman, C., Jönsen, A., Sturfelt, G., Bengtsson, A. A., Gottsäter, A., Lindblad, B., Lindqvist, E., Saxne, T. and Dahlbäck, B.** (2011). Increased plasma levels of the soluble Mer tyrosine kinase receptor in systemic lupus erythematosus relate to disease activity and nephritis. *Arthritis Res. Ther.* **13**, R62.
- Yang, Z., Camp, N. J., Sun, H., Tong, Z., Gibbs, D., Cameron, D. J., Chen, H., Zhao, Y., Pearson, E., Li, X., et al.** (2006). A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration. *Science* **314**, 992–993.
- Yavari, R., Adida, C., Bray-Ward, P., Brines, M. and Xu, T.** (1998). Human Metalloprotease-Disintegrin Kuzbanian Regulates Sympathoadrenal Cell Fate in Development and Neoplasia. *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1161–1167.
- Ye, X., Li, Y., Stawicki, S., Couto, S., Eastham-Anderson, J., Kallop, D., Weimer, R., Wu, Y. and Pei, L.** (2010). An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene* **29**, 5254–5264.
- Yi, Z., Li, L., Matsushima, G. K., Earp, H. S., Wang, B. and Tisch, R.** (2009). A novel role for c-Src and STAT3 in apoptotic cell-mediated MerTK-dependent immunoregulation of dendritic cells. *Blood* **114**, 3191–3198.
- Young, R. W.** (1967). THE RENEWAL OF PHOTORECEPTOR CELL OUTER SEGMENTS. *J Cell Biol* **33**, 61–72.
- Young, R. W.** (1978). The daily rhythm of shedding and degradation of rod and cone outer segment membranes in the chick retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **17**, 105–116.
- Young, R. W. and Bok, D.** (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J. Cell Biol.* **42**, 392–403.
- Zhou, M., Graham, R., Russell, G. and Croucher, P. I.** (2001). MDC-9 (ADAM-9/Meltrin  $\gamma$ ) Functions as an Adhesion Molecule by Binding the  $\alpha\beta 5$  Integrin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **280**, 574–580.



## ANNEXES

Annexe 1 : Book chapter : A comprehensive review of mutations in the MERTK proto-oncogene.

Annexe 2 : Article : Large-scale purification of photoreceptor outer segments for phagocytosis assays on retinal pigment epithelial cells.

# Chapter 35

## A Comprehensive Review of Mutations in the *MERTK* Proto-Oncogene

Célia Parinot and Emeline F. Nandrot

**Abstract** Phagocytosis and elimination of shed aged photoreceptor outer segments (POS) by retinal pigment epithelial cells is crucial for photoreceptor function and survival. Genetic studies on the a natural animal model of recessive retinal degeneration allowed the identification of *MerTK*, the gene encoding the surface receptor required for POS internalization. Following this discovery, screenings of DNA samples from patients have revealed that *MERTK* mutations cause retinal degenerations in humans. *MERTK* patients present some of the classical symptoms of retinitis pigmentosa, but it is atypical in that the disease develops very early during childhood and the macula is also involved early on. Therefore, the phenotype ought to be qualified as a rod-cone dystrophy. Recently, *MERTK* has been implicated in various types of cancers and sclerosis. This review identifies the different *MERTK* mutations known so far and describes associated pathologies.

**Keywords** MerTK • Phagocytosis • Retinal pigment epithelium • RCS rat • Mutations • Rod-cone dystrophies • Retinitis pigmentosa • Photoreceptor death • Proto-oncogene • Cancer

### 35.1 Introduction

Photoreceptors (PRs) constantly renew them the photosensitive disks contained in their outer segments (POS) to counteract the permanent light stress affecting them. POS aged extremities are daily shed and phagocytosed by cells from the retinal pigment epithelium (RPE) (Young and Bok 1969). With a maximum activity 2 h after light onset (LaVail 1976), this process is mainly achieved by two membrane receptors:  $\alpha\beta 5$  integrin allows POS binding (Finnemann et al. 1997) and initiates the rhythm of POS clearance (Nandrot et al. 2004) while MerTK is necessary for POS

---

E. F. Nandrot (✉) • C. Parinot  
 Institut de la Vision, INSERM, U968, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR\_S968, CNRS, UMR\_7210, 17 rue Moreau, 75012 Paris, France  
 e-mail: emeline.nandrot@inserm.fr

© Springer International Publishing Switzerland 2015  
 C. Bowes Rickman et al. (eds.), *Retinal Degenerative Diseases*, Advances in Experimental Medicine and Biology 854, DOI 10.1007/978-3-319-17121-0\_35

engulfment (D'Cruz et al. 2000; Nandrot et al. 2000; Feng et al. 2003). This review focuses on the *MERTK* pathological implications in various tissues.

## 35.2 The MerTK Receptor

### 35.2.1 A Tyrosine Kinase Receptor

*MERTK*, located on chromosome 2q14.1 (Weier et al. 1999), is expressed in several hematopoietic (macrophages), epithelial (RPE) and reproductive tissues (Linger et al. 2008). Its 19 exons encode a 999-amino acid transmembrane receptor (Graham et al. 1994) ranging from 160–205 kDa depending on glycosylation levels. MerTK is constituted of two immunoglobulin (IgG)-like 1 and 2 fibronectin type III (FnIII) extracellular domains, and of an intracellular tyrosine kinase domain including the KWIAIES sequence specific to the TAM family of receptors. MerTK binds two main extracellular ligands, Gas6 (Nagata et al. 1996) and Protein S (Hall et al. 2005), leading to MerTK dimerization, tyrosine autophosphorylations and intracellular signaling (Ling et al. 1996). In macrophages, MerTK mediates the phagocytic clearance of apoptotic cells (Scott et al. 2001).

### 35.2.2 Role in RPE Cells

The Royal College of Surgeons (RCS) rat is a natural animal model which RPE cells are unable to phagocytose shed POS (Bok and Hall 1971). Consequently, debris accumulate causing complete vision loss and PR cell death by 3 months of age (Dowling and Sidman 1962). In 2000, two groups characterized a large genomic deletion in the second exon of *MerTK* leading to a missing protein (D'Cruz et al. 2000; Nandrot et al. 2000).

*In vivo*, the  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin–Mfg-E8 couple rhythmically signals for MerTK phosphorylation at peak phagocytosis time (Nandrot et al. 2004, 2007). In addition, both MerTK ligands are required as double knockout mice present a phenotype similar to RCS rats (Burstyn-Cohen et al. 2012).

## 35.3 MerTK Mutations and Associated Diseases

### 35.3.1 Retinal Degenerations

With an autosomal recessive transmission, *MERTK* mutations (Table 35.1) have been mostly identified in consanguineous families native from Spain (Brea-Fernán-

**Table 35.1** *MERTK* mutations listed in order respective to their protein domain location. Nucleotide/protein changes and corresponding references are detailed. (*Italics* cancer-related reference)

| Protein domain               | Mutation  | Protein defect          | References   |
|------------------------------|---|-------------------------|--|
| Signal peptide               | <i>c.61 + 1G&gt;A</i><br><i>intron 1 splicing</i>   | <i>aberrant protein</i> | Mackay et al. (2010)                                 |
| Ig-like1 #1–FnIII #1         | <i>exons 1–7 deletion</i>                           | <i>aberrant protein</i> | Ostergaard et al. (2011)                             |
| Ig-like1 #2                  | <i>c.718G&gt;T</i><br><i>exon 4</i>                 | <i>p.Glu240X</i>        | Shahzadi et al. (2010)                               |
| FnIII #2                     | <i>exon 8 deletion</i>                              | <i>aberrant protein</i> | Mackay et al. (2010)                                 |
| Intracellular—below membrane | <i>IVS10–2A&gt;G</i><br><i>intron 10 splicing</i>   | <i>aberrant protein</i> | Gal et al. (2000)                                    |
| Tyrosine kinase              | <i>c.1951C&gt;T</i><br><i>exon 14</i>               | <i>p.Arg651X</i>        | Gal et al. (2000)<br>Mackay et al. (2010)            |
|                              | <i>c.2070delAGGAC</i><br><i>exon 15</i>             | <i>aberrant protein</i> | Gal et al. (2000)                                    |
|                              | <i>exon 15 deletion</i>                             | <i>p.Gly654AlafsX41</i> | Siemiakowska et al. (2011)                           |
|                              | <i>c.2164C&gt;T</i><br><i>exon 16</i>               | <i>p.Arg722X</i>        | McHenry et al. (2004)                                |
|                              | <i>c.2180G&gt;A</i><br><i>exon 16</i>               | <i>p.Arg727Gln</i>      | Coppieters et al. (2014)                             |
|                              | <i>c.2189 + 1G&gt;T</i><br><i>exon 16 splicing</i>  | <i>p.His694ValfsX4</i>  | Ebermann et al. (2007)<br>Charbel Issa et al. (2009) |
|                              | <i>IVS16 + 1G&gt;T</i><br><i>intron 16 splicing</i> | <i>aberrant protein</i> | (Brea-Fernandez et al. 2008)                         |
|                              | <i>c.2214delT</i><br><i>exon 17</i>                 | <i>p.Cys738TrpfsX31</i> | Tschernutter et al. (2006)                           |
|                              | <i>c.2323C&gt;T</i><br><i>exon 17</i>               | <i>p.Arg775X</i>        | Ksantini et al. (2012)                               |
| C-terminal                   | <i>c.2487–2A&gt;G</i><br><i>exon 19 splicing</i>    | <i>aberrant protein</i> | Siemiakowska et al. (2011)                           |
|                              | <i>c.2530C&gt;T</i><br><i>exon 19</i>               | <i>p.Arg844Cys</i>      | McHenry et al. (2004)                                |
|                              | <i>c.2593C&gt;T</i><br><i>exon 19</i>               | <i>p.Arg865Trp</i>      | McHenry et al. (2004)<br>Huchtagowder et al. (2012)  |

dez et al. 2008), Morocco (Charbel Issa et al. 2009; Ksantini et al. 2012), the Middle East (Tschernutter et al. 2006; Mackay et al. 2010; Coppieters et al. 2014), Pakistan (Tschernutter et al. 2006; Shahzadi et al. 2010), Asia (Tada et al. 2006; Siemiakowska et al. 2011) and the Faroe Islands (Ostergaard et al. 2011).

Primarily described as retinitis pigmentosa (RP) (Gal et al. 2000), patient phenotypes are atypical. RP, a slow degeneration targeting rods, manifests progressively as night blindness, reduced visual fields, retinal vasculature attenuation, optic disc pallor, bone spicule pigments and deposits in the macula. *MERTK* pa-

tient symptoms are severe, often arise during the first decade of life and worsen quickly with an early macular atrophy. Moreover, some patients show an autofluorescent macula, sign of imperfect POS elimination (Tschernutter et al. 2006). Thus it seems more appropriate to designate *MERTK*-related pathologies as rod-cone dystrophies.

### 35.3.2 Other pathologies

First identified as a proto-oncogene (Graham et al. 1994), MerTK carries a transforming potential on cultured cells (Lierman et al. 2009). Logically, *MERTK* is involved in various types of cancer: upregulated in a large spectrum of malignant cells including leukemia, lymphoma (Linger et al. 2008) and colorectal cancer (Watanabe et al. 2011), its expression is associated with poor prognosis in gastric cancer (Linger et al. 2008). Somatic variants exist in melanoma (p.Pro802Ser) (Tworkoski et al. 2013), multiple myeloma (p.Thr690Ile, p.Glu823Gln; Table 35.1) (Huchtagowder et al. 2012), renal cancer and carcinoma (p.Ala446Gly, p.Ala708Ser) (Greenman et al. 2007). In addition, MerTK expression increases in various sclerotic lesions (Weinger et al. 2009; Hurtado et al. 2011).

### 35.3.3 Other Variants

Non-pathogenic *MERTK* variants p.Arg20Ser, p.Asp118Ser, p.Ala282Thr, p.Arg293His, p.Arg466Lys, p.Asp498Ser, p.Ile518Val and p.Val870Ile have been described (Gal et al. 2000; McHenry et al. 2004; Tada et al. 2006; Tschernutter et al. 2006). Present at similar frequencies in retinal dystrophy and unaffected individuals they are enriched as somatic mutations in cancers (Greenman et al. 2007; Huchtagowder et al. 2012). The pathological implication of some heterozygous missense substitutions present in both patients and their unaffected parents is not clear (p.Glu540Lys, p.Ser661Cys, p.Ile871Thr) (Gal et al. 2000). Yet, heterozygous mutations in Leber Congenital Amaurosis cases seem to co-segregate with other gene defects (p.Phe214Val, p.Pro958Leu) (Li et al. 2011). Taken together, these data suggest that some variants might be pathogenic in combination with other factors.

## 35.4 Perspectives

*MERTK* is now considered as a good target for the treatment of certain cancers (Linger et al. 2013a, 2013b; Schlegel et al. 2013). Various gene therapy approaches have been tested in rodent retinae using adenoviruses (Vollrath et al. 2001), AAVs (Smith et al. 2003; Deng et al. 2012; Conlon et al., 2013) or lentiviruses (Tschernutter et al. 2005). Preservation of PRs and retinal function can persist up to 12 months

post-injection (Tschernutter et al. 2005; Deng et al. 2012). In August 2011, the first phase I clinical trial has been launched in Saudi Arabia on 6 *MERTK* patients (clinicaltrials.gov; NCT01482195) after validation of the vector (Conlon et al. 2013).

## References

- Bok D, Hall MO (1971) The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 49:664–682
- Brea-Fernández AJ, Pomares E, Brión MJ et al (2008) Novel splice donor site mutation in *MERTK* gene associated with retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 92:1419–1423
- Burstyn-Cohen T, Lew ED, Través PG et al (2012) Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron* 76:1123–1132
- Charbel Issa P, Bolz HJ, Ebermann I et al (2009) Characterisation of severe rod-cone dystrophy in a consanguineous family with a splice site mutation in the *MERTK* gene. *Br J Ophthalmol* 93:920–925
- Conlon TJ, Deng W-T, Erger K et al (2013) Preclinical potency and safety studies of an AAV2-mediated gene therapy vector for the treatment of *MERTK* associated retinitis pigmentosa. *Hum Gene Ther Clin Dev* 24:23–28
- Coppieters F, Van Schil K, Bauwens M et al (2014) Identity-by-descent-guided mutation analysis and exome sequencing in consanguineous families reveals unusual clinical and molecular findings in retinal dystrophy. *Genet Med*. doi:10.1038/gim.2014.24
- D'Cruz PM, Yasumura D, Weir J et al (2000) Mutation of the receptor tyrosine kinase gene *Merk* in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum Mol Genet* 9:645–651
- Deng W-T, Dinculescu A, Li Q et al (2012) Tyrosine-mutant AAV8 delivery of human *MERTK* provides long-term retinal preservation in RCS rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:1895–1904
- Dowling JE, Sidman RL (1962) Inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 14:73–109
- Ebermann I, Walger M, Scholl HP et al (2007) Truncating mutation of the *DFNB59* gene causes cochlear hearing impairment and central vestibular dysfunction. *Hum Mutat* 28:571–577
- Feng W, Yasumura D, Matthes MT et al (2003) *Merk* triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 277:17016–17022
- Finnemann SC, Bonilha VL, Marmorstein AD et al (1997) Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires  $\alpha(v)\beta5$  integrin for binding but not for internalization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:12932–12937
- Gal A, Li Y, Thompson DA et al (2000) Mutations in *MERTK*, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 26:270–271
- Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL et al (1994) Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, *c-mer*. *Cell Growth Differ* 5:647–657
- Greenman C, Stephens P, Smith R et al (2007) Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446:153–158
- Hall MO, Obin MS, Heeb MJ et al (2005) Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 81:581–591
- Huchtagowder V, Meyer R, Mullins C et al (2012) Resequencing analysis of the candidate tyrosine kinase and RAS pathway gene families in multiple myeloma. *Cancer Genet* 205:474–478
- Hurtado B, Muñoz X, Recarte-Pelz P et al (2011) Expression of the vitamin K-dependent proteins GAS6 and protein S and the TAM receptor tyrosine kinases in human atherosclerotic carotid plaques. *Thromb Haemost* 105:873–882
- Ksantini M, Lafont E, Bocquet B et al (2012) Homozygous mutation in *MERTK* causes severe autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Eur J Ophthalmol* 22:647–653

- LaVail MM (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194:1071–1074
- Lierman E, Van Miegroet H, Beullens E et al (2009) Identification of protein tyrosine kinases with oncogenic potential using a retroviral insertion mutagenesis screen. *Haematologica* 94:1440–1444
- Li L, Xiao X, Li S (2011) Detection of variants in 15 genes in 87 unrelated Chinese patients with Leber congenital amaurosis. *PLoS One* 6:e19458
- Ling L, Templeton D, Kung HJ (1996) Identification of the major autophosphorylation sites of Nyk/Mer, an NCAM-related receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 271:18355–18362
- Linger RMA, Keating AK, Earp HS et al (2008) TAM receptor tyrosine kinases: biologic functions, signaling, and potential therapeutic targeting in human cancer. *Adv Cancer Res* 100:35–83
- Linger RMA, Cohen RA, Cummings CT et al (2013a) Mer or Axl receptor tyrosine kinase inhibition promotes apoptosis, blocks growth and enhances chemosensitivity of human non-small cell lung cancer. *Oncogene* 32:3420–3431
- Linger RMA, Lee-Sherick AB, DeRyckere D et al (2013b) Mer receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 122:1599–1609
- Mackay DS, Henderson RH, Sergouniotis PI et al (2010) Novel mutations in MERTK associated with childhood onset rod-cone dystrophy. *Mol Vis* 16:369–377
- McHenry CL, Liu Y, Feng W et al (2004) MERTK arginine-844-cysteine in a patient with severe rod-cone dystrophy: loss of mutant protein function in transfected cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:1456–1463
- Nagata K, Ohashi K, Nakano T et al (1996) Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 271:30022–30027
- Nandrot E, Dufour EM, Provost AC et al (2000) Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol Dis* 7:586–599
- Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE et al (2004) Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *J Exp Med* 200:1539–1545
- Nandrot EF, Anand M, Almeida D et al (2007) Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12005–12010
- Ostergaard E, Duno M, Batbayli M et al (2011) A novel MERTK deletion is a common founder mutation in the Faroe Islands and is responsible for a high proportion of retinitis pigmentosa cases. *Mol Vis* 17:1485–1492
- Schlegel J, Sambade MJ, Sather S et al (2013) MERTK receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in melanoma. *J Clin Invest* 123:2257–2267
- Scott RS, McMahon EJ, Pop SM et al (2001) Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411:207–211
- Shahzadi A, Riazuddin SA, Ali S et al (2010) Nonsense mutation in MERTK causes autosomal recessive retinitis pigmentosa in a consanguineous Pakistani family. *Br J Ophthalmol* 94:1094–1099
- Siemiakowska AM, Arimadyo K, Moruz LM et al (2011) Molecular genetic analysis of retinitis pigmentosa in Indonesia using genome-wide homozygosity mapping. *Mol Vis* 17:3013–3024
- Smith AJ, Schlichtenbrede FC, Tschernutter M et al (2003) AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 8:188–195
- Tschernutter M, Schlichtenbrede FC, Howe S et al (2005) Long-term preservation of retinal function in the RCS rat model of retinitis pigmentosa following lentivirus-mediated gene therapy. *Gene Ther* 12:694–701
- Tschernutter M, Jenkins SA, Waseem NH et al (2006) Clinical characterisation of a family with retinal dystrophy caused by mutation in the MERTK gene. *Br J Ophthalmol* 90:718–723
- Tworokski KA, Platt JT, Bacchiocchi A et al (2013) MERTK controls melanoma cell migration and survival and differentially regulates cell behavior relative to AXL. *Pigment Cell Melanoma Res* 26:527–541

- 197 Vollrath D, Feng W, Duncan JL et al (2001) Correction of the retinal dystrophy phenotype of the  
198 RCS rat by viral gene transfer of Mertk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12584–12589
- 199 Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y et al (2011) Differential gene expression signatures between  
200 colorectal cancers with and without KRAS mutations: crosstalk between the KRAS pathway  
201 and other signalling pathways. *Eur J Cancer* 47:1946–1954
- 202 Weier HU, Fung J, Lersch RA (1999) Assignment of protooncogene MERTK (a.k.a. c-mer) to hu-  
203 man chromosome 2q14.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 84:91–92
- 204 Weinger JG, Omari KM, Marsden K et al (2009) Up-regulation of soluble Axl and Mer receptor  
205 tyrosine kinases negatively correlates with Gas6 in established multiple sclerosis lesions. *Am*  
206 *J Pathol* 175:283–293
- 207 Young RW, Bok D (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment  
208 renewal process. *J Cell Biol* 42:392–403



Video Article

# Large-Scale Purification of Porcine or Bovine Photoreceptor Outer Segments for Phagocytosis Assays on Retinal Pigment Epithelial Cells

Célia Parinot<sup>1,2,3</sup>, Quentin Rieu<sup>1,2,3</sup>, Jonathan Chatagnon<sup>1,2,3</sup>, Silvia C. Finnemann<sup>4</sup>, Emeline F. Nandrot<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U968

<sup>2</sup>Sorbonne Universités, UPMC Paris 06, UMR\_S 968, Institut de la Vision

<sup>3</sup>CNRS, UMR\_7210

<sup>4</sup>Department of Biological Sciences, Center for Cancer, Genetic Diseases and Gene Regulation, Fordham University

Correspondence to: Emeline F. Nandrot at [emeline.nandrot@inserm.fr](mailto:emeline.nandrot@inserm.fr)

URL: <http://www.jove.com/video/52100>

DOI: [doi:10.3791/52100](https://doi.org/10.3791/52100)

Keywords: Immunology, Issue 94, Retina, photoreceptor, outer segment, sucrose gradient, purification, ultracentrifugation, phagocytosis assay, retinal pigment epithelium

Date Published: 12/12/2014

Citation: Parinot, C., Rieu, Q., Chatagnon, J., Finnemann, S.C., Nandrot, E.F. Large-Scale Purification of Porcine or Bovine Photoreceptor Outer Segments for Phagocytosis Assays on Retinal Pigment Epithelial Cells. *J. Vis. Exp.* (94), e52100, doi:10.3791/52100 (2014).

## Abstract

Analysis of one of the vital functions of retinal pigment epithelial (RPE) cells, the phagocytosis of spent aged distal fragments of photoreceptor outer segments (POS) can be performed *in vitro*. Photoreceptor outer segments with stacks of membranous discs containing the phototransduction machinery are continuously renewed in the retina. Spent POS are eliminated daily by RPE cells. Rodent, porcine/bovine and human RPE cells recognize POS from various species in a similar manner. To facilitate performing large series of experiments with little variability, a large stock of POS can be isolated from porcine eyes and stored frozen in aliquots. This protocol takes advantage of the characteristic of photopigments that display an orange color when kept in the dark. Under dim red light, retinæ are collected in a buffer from opened eyecups cut in halves. The retinal cell suspension is homogenized, filtered and loaded onto a continuous sucrose gradient. After centrifugation, POS are located in a discrete band in the upper part of the gradient that has a characteristic orange color. POS are then collected, spun, resuspended sequentially in wash buffers, counted and aliquoted. POS obtained this way can be used for phagocytosis assays and analysis of protein activation, localization or interaction at various times after POS challenge. Alternatively, POS can be labeled with fluorophores, e.g., FITC, before aliquoting for subsequent fluorescence quantification of POS binding or engulfment. Other possible applications include the use of modified POS or POS challenge combined with stress conditions to study the effect of oxidative stress or aging on RPE cells.

## Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/52100/>

## Introduction

In the retina, vision is triggered by isomerization of photosensitive molecules called opsins, before being transformed into a signal that can be transmitted between neurons up to the visual areas in the brain. These molecules are embedded in stacks of membranous disks resembling pancakes that constitute the outer segment portions of photoreceptor cells (PRs). Being subjected to constant exposure to light and therefore considerable levels of oxidative stress, PRs continuously renew their outer segments to limit potential oxidative damage. Photoreceptor outer segments are in close contact with apical microvilli of the neighboring retinal pigment epithelial (RPE) cells. RPE cells constitute the outer part of the blood-retinal barrier and ensure numerous tasks that are crucial for photoreceptors health and function<sup>1</sup>, such as quenching light rays via melanin pigments, re-isomerization of the photoreactive opsin component retinal, providing nutrients and growth factors, participating in PR metabolite disposal.

In addition, RPE cells eliminate spent POS and recycle their components, a daily occupation that is regulated by the circadian rhythm in mammalian retina<sup>2,3</sup>. The clearance of shed POS is absolutely necessary for PR survival. When it is completely abrogated, POS debris accumulate and PRs degenerate causing rapid vision loss<sup>4,5</sup>. If the rhythmic profile is lost and replaced by a constant activity, PR and RPE defects accumulate with age<sup>6</sup>. Therefore, it is very important to characterize the molecular regulation of RPE phagocytosis *in vitro* in order to understand phenotypes linked to its dysfunction. Interestingly, the molecular machinery in RPE cells is very similar to the one used by macrophages to clear apoptotic cells and both are dependent on recognition of exposed phosphatidylserine on phagocytic debris<sup>7-9</sup>. Still, RPE cells and macrophages regulate phagocytosis differently, as macrophages opt for immediate elimination of apoptotic cells at encounter time while RPE cells rhythmically engulf POS only once a day despite their permanent contact with outer segments. This suggests specific regulation mechanisms that are not yet fully understood.

Many of the molecules implicated in the RPE phagocytic machinery have been identified or validated thanks to the use of isolated POS and cell culture phagocytosis assays. The alphavbeta5 integrin receptor located at the RPE apical cell surface, in coordination with its ligand MFG-E8, binds specifically to POS<sup>10-12</sup>, which are then internalized via the MerTK tyrosine kinase receptor<sup>13-15</sup>. The CD36 scavenger receptor

has been shown to participate in POS intake and influence its speed<sup>16,17</sup>, and might serve as a sensor of oxidized phospholipids at the POS surface<sup>18</sup>. Internalization needs the recruitment of F-actin cytoskeleton-associated proteins such as annexin 2<sup>19</sup>, myosin II<sup>20</sup> and myosin VIIA<sup>21,22</sup>. Native or oxidized POS *in vitro* are also utilized to understand aging phenotypes of RPE cells *in vivo* linked to accumulation of poorly digested oxidized POS<sup>23-28</sup>. The generation of RPE cells derived from stem cells has initiated a new application for isolated POS that are used to prove functionality of cells before they are transplanted to animals or patients<sup>29,30,27</sup>.

First described by Molday and colleagues in 1987<sup>31</sup>, the protocol for isolation of bovine POS combines an ultracentrifugation step of retinal homogenates on continuous sucrose gradients with observation of the characteristic orange appearance of unbleached retinal photopigment (carrying 11-*cis* retinal). In the past 10 years, due to precautions taken in order to minimize risk of mad cow disease, use of porcine eyes has become increasingly prominent. The protocol described here shows how to obtain large amounts of POS from porcine or bovine eyes that can be aliquoted and stored for extended periods of time. This eliminates the need to prepare POS from rodent eyes, which requires using a large number of animals per POS preparation and assay<sup>32,33,21,22</sup>. In addition, details about POS labeling before storage using fluorescent molecules are given, to quantify and visualize POS in a simplified and comparable manner for some applications compared to labeling POS after the phagocytosis assay<sup>32,10</sup>. Therefore, these large stocks allow for reproducibility and ease of use in many different types of experiments.

## Protocol

This POS isolation experiment is time consuming and may require up to 12 hr to complete if POS are labeled before storage. The protocol has been adapted from a paper published by R.S. Molday and colleagues in 1987<sup>31</sup> and modified by S.C. Finnemann and colleagues in 1997<sup>10</sup>.

Animals were handled according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. Protocols were reviewed and approved by the Charles Darwin Ethics Committee from University Pierre and Marie Curie-Paris 06 and the Fordham University Institutional Animal Care and Use Committee.

## 1. General Set Up

1. Obtain 80 fresh pig or cow eyes as fresh as soon after slaughtering as possible and keep them chilled in the dark. Provide instructions to the provider so the company proceeds the same way. This protocol is optimized for 80 eyes. To proceed with more eyes and get bigger stocks (e.g., from 160 eyes), double the solution quantities and perform 2 rounds of ultracentrifugation; pool samples later at the collection step (see **step 2.2.2**).
2. Set up on the bench the red safelight lamp, absorbent pads, wipes (**Materials table**). Prepare 15 cm dishes and biohazard bags for waste collection (unused eye parts, vitreous...). Wear tight-fitting labcoat, gloves, sleeve protectors and goggles.
3. Precautions:
  1. Pre-chill all solutions then keep them cold during all steps. Keep eyes and gradients chilled on ice as much as possible.
  2. **Keep eyes and derived tissues in the dark** as much as possible until the collection step after the ultracentrifugation to avoid photobleaching of visual pigments and loss of the orange-pink color of the active form of the photopigments.

## 2. Protocol Actions

1. **Prepare solutions and gradients:**
  1. Thaw taurine stock completely using a 37 °C water bath.
  2. Prepare all solutions from stock solutions (**Table 1**, Stock solutions) and mix thoroughly the sucrose with other ingredients using a magnetic stirrer for each solution.
    1. Prepare 15 ml of the homogenization solution to a final concentration of 20% sucrose, 20 mM tris acetate pH7.2, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose and 5 mM taurine.
    2. Prepare the 25% sucrose solution to a final concentration of 25% sucrose (using 70% sucrose stock), 20 mM tris acetate pH 7.2, 10 mM glucose and 5 mM taurine.
    3. Prepare the 60% sucrose solution to a final concentration of 60% sucrose (using sucrose powder), 20 mM tris acetate pH7.2, 10 mM glucose and 5 mM taurine.
    4. Prepare the Wash 1 solution to a final concentration of 20 mM tris acetate pH 7.2 and 5 mM taurine.
    5. Prepare the Wash 2 solution to a final concentration of 10% sucrose, 20 mM tris acetate pH 7.2 and 5 mM taurine.
    6. Prepare the Wash 3 solution to a final concentration of 10% sucrose, 20 mM sodium phosphate pH 7.2 and 5 mM taurine.
  3. Steady the gradient maker on a magnetic stirrer and insert a stir bar in the chamber closest to the exit where the 60% solution will be inserted. Use a cut-off P200 pipet tip placed at the exit of the tubing to achieve proper casting speed.
  4. Cast linear gradients delicately by diluting and stirring the 60% sucrose solution with the 25% one using 12 ml from each solution (*i.e.*, total 6 tubes for 80 eyes) in pre-chilled ultracentrifuge tubes. Stir the gradually-diluting 60% sucrose solution well. Steady the speed of gradient flow, pouring the solution smoothly and not too fast.  
NOTE: In order to get a continuous, linear gradient, keep the pipet tip opening right at the surface of the solution for the entire gradient formation.
  5. Let the gradients sit on ice for around 1 hr for stabilization. Keep the gradients chilled until loaded. Do not shake the tubes to prevent disruption of the gradient.
2. **Tissue collection:**
  1. Collect tissues under dim red light. Take an eye into one hand and poke the front with edge of razor blade while holding the eye away (to avoid splashing; **Figure 1**). Use the razor blade to cut the anterior eyeball into 2 halves (cornea plus at least 5 mm into the sclera). Remove the lens and flip the eyecup inside out so that it can be held over the tip of one finger thus exposing the retina.

2. Using the razor blade at an angle, gently scrape the retina, detaching easily and appearing as a pinkish layer, off the tapetum surface and cut at the optic nerve head (**Figure 1**). Collect all retinas in 2 x 50 ml tubes each containing 15 ml of homogenization solution on ice.
3. **Retina homogenization:**
  1. Shake the suspension vigorously by hand for 2 min in order to disrupt the different cell layers, break POS off the rest of the PR cell, fragment POS and homogenize the retina suspension.
  2. Filter 3x through a double-layer of clean gauze to remove large tissue fragments and collect the flow-through in clean 50 ml tubes (**Figure 1**). The retinal suspension being quite thick, to maximize the yield, gently press on the gauze to release remaining fragmented tissues after each filtration.
3. **Photoreceptor outer segment fragment (POS) isolation:**
  1. Gently lay the crude retina prep, around 6 - 7 ml per tube, over 6 x 30 ml ultracentrifuge tubes each containing 24 ml of fresh chilled continuous 25 - 60% sucrose gradient (**Figure 1**). Balance the opposing tubes as appropriate for the rotor to be used. Ultracentrifuge at 106,000 x g for 50 min at 4 °C.
  2. Remove most of the solution above the orange-pink band in the upper third of gradient by aspiration (**Figure 2A**). Collect the orange-pink band with a cut-off P1000 tip into a beaker. Discard the rest after neutralizing using bleach (biological waste).
  3. Dilute with ~4 - 5 volumes of ice-cold Wash 1 solution. Separate into as many 30 ml tubes as needed. Centrifuge at 3,000 x g for 10 min at 4 °C. Carefully discard the supernatant.
  4. Resuspend pellets in 10 ml Wash 2 solution and spin at 3,000 x g for 10 min as detailed above. Resuspend pellets in 15 ml Wash 3 and spin again at 3,000 x g for 10 min. Combine suspensions from several pellets to reduce the number of tubes needed before centrifugation in Wash 2 and Wash 3 solutions.
4. **POS aliquoting without labeling:**
  1. Resuspend POS in 10 - 20 ml DMEM. Predilute 10 µl in 490 µl DMEM (1:50) and count elongated as well as whirled POS in a cell counting chamber (**Figure 2B**). Calculate yield and concentration in POS particles per mL.  
NOTE: The yield varies, depending mostly on the age and strain of pigs/cows and size of the eyes, e.g., a good preparation ranges from 5 - 8 x 10<sup>9</sup> POS from 80 pig eyes.
  2. Decide on the final DMEM volume (typically 10 - 20 ml) and add sucrose to yield a final concentration of 2.5% sucrose.
  3. Prepare aliquots of the desired size, e.g., 5 x 10<sup>7</sup> POS per tube for a 2 ml resuspension volume for a 96-well experiment at 40 µl/well. Spin 1 aliquot for 5 min at 2,300 x g at RT and evaluate pellet size. Prepare various aliquot sizes for different application volumes as POS should NOT be frozen and thawed twice.
  4. Freeze POS aliquots at -80 °C until further use.  
NOTE: Aliquots are stable for many months. In our hands, unlabeled or labeled POS can be stored for at least one year.
5. **POS labeling and aliquoting:**  
NOTE: We typically use FITC to label POS for quantification of phagocytosis assays, but other dyes may be used as well depending on needs.
  1. Resuspend 10 mg FITC vial at a 2.5 mg/ml concentration in 0.1 M Na carbonate buffer pH 9.5 by mixing 2.6 ml 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> pH 8.4 with 1.4 ml 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11.5 (**Table 2**, Stock solutions). Rotate for 1 hr at RT while protecting from light and spin for 5 min at maximum speed to pellet non-resuspended FITC solids.
  2. Resuspend the POS pellet in 10 ml of Wash 3 solution (or DMEM) and add 2 ml of FITC solution for 80 eyes. Store leftover FITC frozen at -80 °C. Rotate for at least 1.5 hr at RT. Protect from light using aluminum foil.
  3. Wash labeled POS twice using Wash 3 solution as described in **section 2.3.4**, then once or twice in DMEM until almost no free FITC is seen in the supernatant fraction. Resuspend POS in DMEM and proceed as for unlabeled POS for counting and aliquoting (**section 2.4**).
6. **Using POS in experiments:**
  1. Thaw POS at RT, and keep them in the dark as much as possible if they are fluorescently-labeled. Spin for 5 min at 2,300 x g at RT. Aspirate the supernatant.
  2. Immediately resuspend in appropriate volume of assay solution as dictated by the experiment. In case of different times of POS challenge, store resuspended POS at RT in the dark between time-points for several hours.

## Representative Results

The combination of the linear sucrose gradient and the ultracentrifugation allows the separation of the different components of the retinal suspension by density. Heavy larger retinal debris and RPE cells sink to or near the bottom of the gradient (**Figure 2A**). Lighter POS and lighter individual cells or cell debris from the retina migrate as separate bands to reach the top half of the gradient by the end of the centrifugation period. By keeping the eyes and the samples in the dark until after the centrifugation step, the band containing POS can be immediately recognized by its bright orange color. The width and intensity of this band depends on gradient quality and tube height (89 mm height is preferred). Typically, when isolated properly POS should appear elongated, straight or bent when observed on a microscope slide (**Figure 2B**). Depending on the focus plane on the microscope, they can appear either dark or shiny. If not resuspended properly, they will stay in clumps. If they are damaged (see paragraph below), they will appear as much smaller pieces, a little like a 'dusty' background.

Problems that can arise are mostly related to three issues. The first possible issue is that the shaking step of the retinal homogenates is not vigorous enough, which leads to POS remaining attached to PRs thus to decreased yield. The second possible issue is linked to poor gradient casting or gradient quality loss to insufficient stabilization time before loading or excessive tube shaking at any step before the collection. In this case, the bands cannot be properly distinguished and POS cannot be collected in the corresponding tube. Finally, the third potential issue

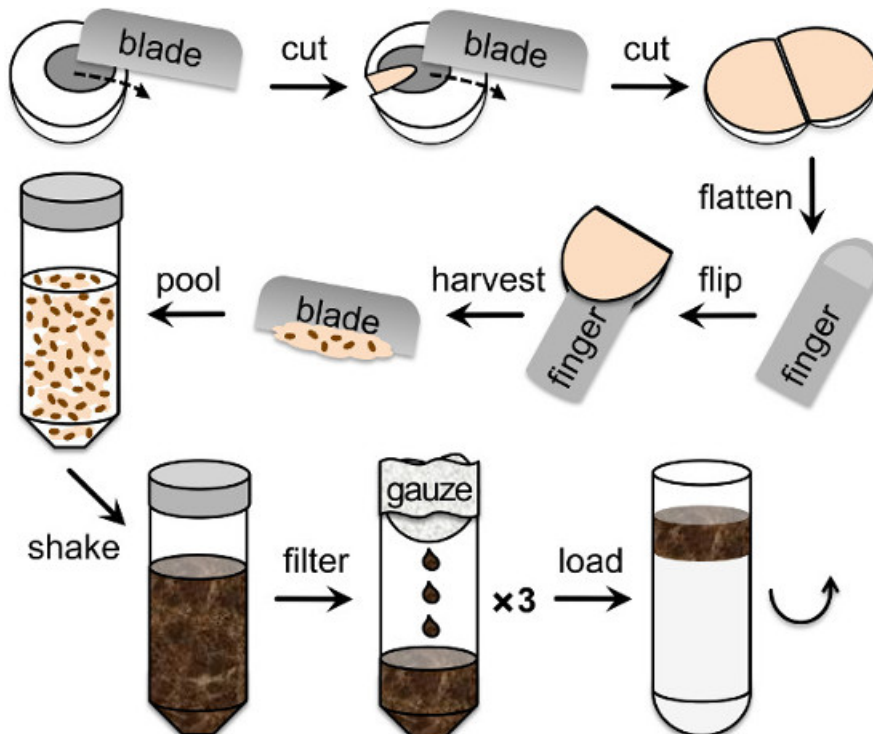
arises if the pH of any of the solutions is wrong: POS membranes may disintegrate and only small POS debris appears on the microscope when visualizing them for yield assessment.

Purified POS can be used for a number of different applications related to studying the phagocytic function of RPE cells. RPE cells are usually used as cell lines or in primary culture from animal models<sup>32,6,12,18-21</sup>. More recently, RPE cells derived from reprogrammed stem cells like iPSC or ESC have been used<sup>29,30,27,34</sup>. Isolated POS serve to test directly the phagocytic ability of mutant RPE cells; e.g., POS are readily phagocytosed by primary RPE cells from wild-type mice, whereas cells from *beta5 integrin* and *MFG-E8* knockout mice phagocytose less POS in the same amount of time<sup>6,12</sup>. Quantification of POS phagocytosis can be done either by counting FITC-labeled POS manually on microscope pictures<sup>6</sup> (**Figure 3A**), using equipment capable of reading fluorescence intensity<sup>10,24,15,35</sup> or a flow cytometer after cell trypsinization<sup>36,27</sup>. More recently, POS intake and degradation has been evaluated on immunoblots probed for opsins<sup>37,38,27</sup>.

*In vivo*, the POS uptake process occurs sequentially as recognition/binding precedes synchronized internalization<sup>6</sup>. The different phases of uptake can also distinguished *in vitro* by using appropriate experimental procedures<sup>39</sup>. Pulse-chase experiments can be performed using temperature switch: POS binding occurs at 20 °C while internalization needs a temperature of 37 °C to proceed<sup>32,40,7</sup>. This distinction also exists in macrophages, which can recognize POS as well and in which the molecular machinery to eliminate apoptotic cells is very similar to the RPE's machinery<sup>7</sup>. After FITC-POS phagocytosis, binding and internalization can be quantified in separate samples by quenching the FITC-fluorescence of surface-bound POS during pre-incubation with trypan blue before fixing the cells<sup>10</sup>. In trypan blue-treated cells, only internal POS will be visualized, and bound POS can be quantified by subtracting internal POS from total POS fluorescence counts. When phagocytosis is evaluated on immunoblots obtained using lysates collected after POS challenge, an equivalent treatment with EDTA before lysis will allow the detachment of POS bound at the cell surface for internal versus total POS phagocytosis comparison<sup>37,38</sup>.

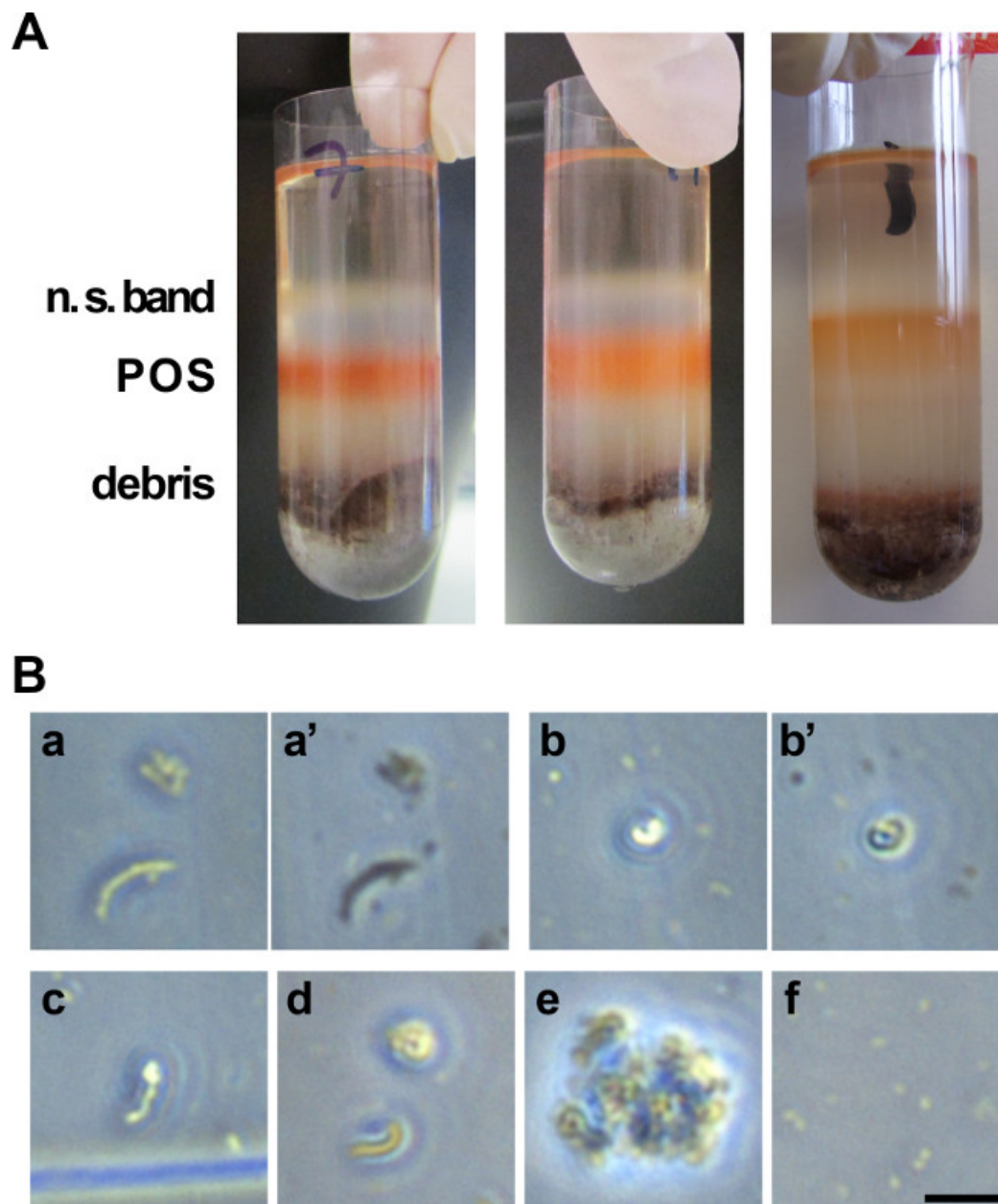
Tremendous advances have been made in the identification of the phagocytic machinery thanks to experiments employing purified POS. Protein recruitment can be assessed by immunofluorescence co-localization assays<sup>13-15,19-21,37,41</sup> (**Figure 3B**). Protein recruitment or activation can be validated on immunoblots after immunoprecipitation or by checking for phosphorylation<sup>7,10,12-15,17,19,20,27,35,37,41</sup> (**Figure 3C**). More open-ended studies on overall gene expression changes after different times of POS challenge have also been performed<sup>42</sup>.

Isolated POS can also be used to study POS elimination by RPE cells. Indeed, during normal aging and/or when POS are not digested properly, POS degradation products accumulate gradually as lipofuscin deposits and can lead to pathologies due to oxidation mechanisms<sup>24,27</sup>. Hence, understanding the effects of light and related oxidative damage may require POS challenge of RPE cells<sup>18,26</sup>. Finally, repeated feeding with normal<sup>27</sup> or oxidized<sup>25,28</sup> POS can be used to induce cumulative effects in RPE cells in culture in order to understand pathological mechanisms that develop *in vivo* over longer periods of time.

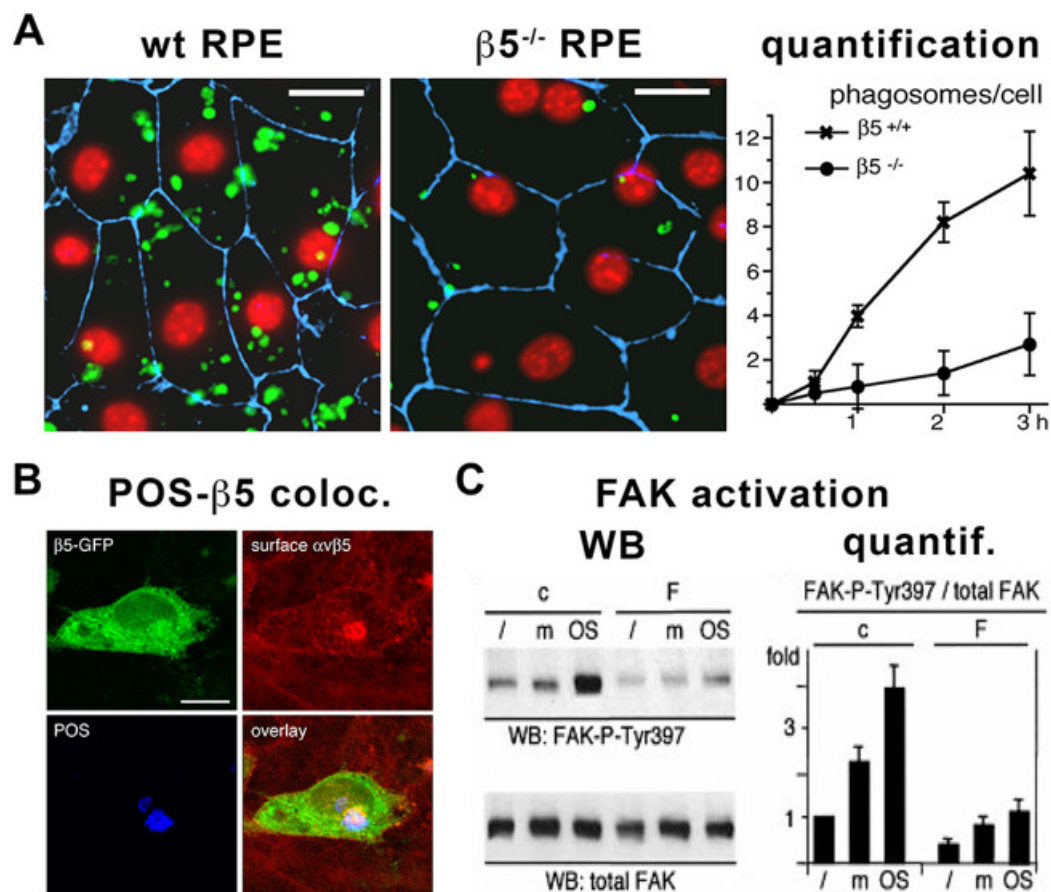


**Figure 1. Retina isolation from porcine eyes.** Drawing showing the different steps of the eye dissection in order to collect and homogenize the retina before the ultracentrifugation step on continuous sucrose gradients, starting top left. A 60 mm wide blade is used to cut the eye sequentially on one side and then the other in order to be able to stretch it inside-out on a finger tip, thus exposing the retina. Next, the retina is collected by scrapping it from the tapetum with the blade. Pooled retinae are then shaken thoroughly in homogenization buffer, filtered 3 times through double layers of gauze and delicately poured on top of the linear 25 - 60% sucrose gradient.





**Figure 2. POS purification from porcine eyes.** (A) Photograph of the various layers observed on a 25 - 60% sucrose gradient after ultracentrifugation of retina homogenates. The orange band corresponds to POS to be collected. The white upper band corresponds to non-POS related materials, as well as larger debris migrating near or at the bottom of the tube. (B) Picture of isolated POS as observed on a bright field microscope on a counting cell for yield assessment. POS exist in elongated (a, a', c, d) and whirled (a, a', b, b', d) forms. Some elongated POS can display a coiled extremity (c). When changing the plane of focus, POS appearance shifts from shiny to dark (compare a and a', b and b'). Panel e illustrates POS that have not been resuspended properly and reside in clumps. Panel f shows POS that have been damaged and are not usable, only small pieces are detectable. Scale 10  $\mu$ m. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)



**Figure 3. Analysis of RPE phagocytosis using purified POS.** (A) Confocal microscope picture and corresponding quantification of the number of phagosomes per cell with time showing that FITC-labeled POS (green) have been less phagocytosed by RPE primary cells isolated from *beta5 integrin knockout* ( $\beta 5^{-/-}$ ) compared to wild-type (wt or  $\beta 5^{+/+}$ ) control mice as indicated. Nuclei (red) were labeled using DAPI and cell junctions (blue) using the tight junction marker ZO-1. Scale bars 10  $\mu$ m. Reproduced from ©Nandrot *et al.*, 2004, originally published in *The Journal of Experimental Medicine* 200(12):1539-1545. (B) Confocal microscope pictures showing co-localization (yellow-magenta, bottom right panel) between  $\beta 5$ -GFP fusion proteins (green, top left panel), surface  $\alpha 5 \beta 5$  integrin receptors (red, top right panel) and POS (blue, bottom left panel). Scale bar 10  $\mu$ m. Reproduced from Nandrot *et al.*, 2012, originally published in *Biology of the Cell* 104(6):326-341, ©Portland Press Limited. (C) Immunoblots (WB) and corresponding quantification (quantif.) showing that POS challenge (POS) increases phosphorylation of FAK on the Tyr397 residue when compared without treatment (/) or challenged with medium alone (m) in control cells (c) while cells expressing an inactivated form of FAK (F) do not react, as indicated. Reproduced from Finnemann, 2003, originally published in *EMBO Journal* 22(16):4143-4154. [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

| Stock solution                                | Storage temperature |
|---|---------------------|
| 70% sucrose                                   | 4 °C                |
| 100 mM glucose                                | 4 °C                |
| 1 M MgCl <sub>2</sub>                         | RT                  |
| 0.5 M taurine                                 | -20 °C              |
| 200 mM tris acetate pH 7.2                    | RT                  |
| 200 mM sodium phosphate pH 7.2                | RT                  |
| 0.1 M NaHCO <sub>3</sub> pH 8.4               | RT                  |
| 0.1 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH 11.5 | RT                  |

**Table 1. Recipes of stock solutions and associated storage temperatures.**

## Discussion

Three steps or conditions are crucial for an optimized purification: quality of gradient casting and delicate gradient tubes manipulation, keeping tissues chilled and in the dark until the collection step, strength of shaking of retinal homogenates to obtain proper POS isolation from the rest of the PR cell. If some issues arise in seeing the orange band properly, they are most likely due to one of the three reasons above (see also

the second paragraph of the **Results** section). Some modification of certain conditions is possible, like the use of a 27 - 50% sucrose gradient concentration<sup>32</sup> or of Optiprep step gradients<sup>33,21</sup>.

Some caution needs to be taken regarding aliquots for experiments as POS should not be frozen and thawed twice. Therefore, it is useful to prepare various sizes for different application volumes.

POS pre-labeling should be used with caution. Covalent labeling generates very highly fluorescent POS that make co-localization studies difficult. Moreover, pre-labeling followed by freeze-thaw may not maintain POS surface characteristics and alter POS immunogenicity. Hence, for co-localization assays it is advisable to store unlabeled POS and label them after thaw immediately before using them for an experiment<sup>10,13-15,32</sup>.

Preparing large-scale POS stocks is economical: a one-day preparation yields reliable experimental material for numerous experiments. Moreover, using rodent retinas to prepare POS for the same number of assays would require very large numbers of animals. Like synthetic particles like beads, a frozen stock of POS will provide a highly consistent tool to test directly the phagocytic ability of RPE cells. Unlike synthetic beads targeting other particle ingestion mechanism such as endocytosis not reacted to POS phagocytosis<sup>43,44</sup>, POS isolated using our protocol are physiologically-relevant phagocytic particles: (1) Isolated POS expose phosphatidylserines, a critical "eat me" signal recognized by the RPE's phagocytic machinery; (2) POS can be efficiently digested by RPE cells after uptake and they thus allow studying all phases of RPE phagocytosis. A possible drawback to the use of porcine or bovine POS could be any species difference between POS as most cell culture phagocytosis assays do not use porcine RPE cells. For instance, the overall cone to rod ratio varies between species – from approximately 2 - 3% in rodents to 5% in humans and 20% in pigs – and cones are concentrated in the macular region in humans. However, current data on the phagocytic machinery show that POS particles are recognized by RPE cell receptors due to their ability to bind soluble ligands, such as the integrin ligand MFG-E8<sup>9,12</sup> and MerTK ligands Gas6 and Protein S<sup>45</sup>. These ligand proteins bind to phosphatidylserines regardless of species<sup>7-9,21,22,31-33</sup> but may bridge to RPE receptors in a species-specific manner. Potential pitfalls from using porcine/bovine POS for RPE uptake assays can just be avoided by supplementing soluble ligands during assays that are tailored to the origin of the RPE to be used.

More recently, generation of RPE cells derived from reprogrammed stem cells like ES cells or iPS have instigated a renewed interest for isolated POS<sup>27,29,30,34</sup>. These RPE cells may be derived from healthy donors or from patients carrying specific mutant genes. They can either be explored functionally to characterize the precise cellular phenotypic effect of the mutations present, or they require to be validated for their phagocytic function before potential transplantation therapies<sup>27,30,34</sup>. These new approaches open a new demand for POS purified on a large scale, as RPE phagocytosis constitutes one of RPE cell main functions and reproducible tests are recommended for reliable comparison between sets of cells.

## Disclosures

The authors declare that they have no competing financial interest.

## Acknowledgements

This work was supported by Agence Nationale de la Recherche (Jeunes Chercheuses/Jeunes Chercheurs to EFN), Fondation Voir et Entendre and Fondation Bettencourt Schueller (Young Investigator Grants to EFN), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, permanent position for EFN), and The National Eye Institute of the National Institutes of Health (R01-EY13295 to SCF). Additionally, the Institut de la Vision is funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre National de la Recherche Scientifique and Département de Paris.

## References

1. Strauss, O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* **85** (3), 845-881, (2005).
2. Young, R.W., & Bok, D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J. Cell Biol.* **42** (2), 392-403, (1969).
3. LaVail, M.M. Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science*. **194** (4269), 1071-1074, (1976).
4. Mullen, R.J., & LaVail, M.M. Inherited retinal dystrophy: primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science*. **192** (4241), 799-801, (1976).
5. Nandrot, E., et al. Homozygous deletion in the coding sequence of the c-mer gene in RCS rats unravels general mechanisms of physiological cell adhesion and apoptosis. *Neurobiol. Dis.* **7** (6 Pt B), 586-599, (2000).
6. Nandrot EF, Kim Y, Brodie SE, Huang X, Sheppard D, & Finnemann, S.C. Loss of synchronized retinal phagocytosis and age-related blindness in mice lacking alphavbeta5 integrin. *J. Exp. Med.* **200** (12), 1539-1545, (2004).
7. Finnemann, S.C., & Rodriguez-Boulan, E. Macrophage and retinal pigment epithelium phagocytosis: apoptotic cells and photoreceptors compete for alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins, and protein kinase C regulates alphavbeta5 binding and cytoskeletal linkage. *J. Exp. Med.* **190** (6), 861-874, (1999).
8. Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., & Haslett, C. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature*. **343** (6254), 170-173, (1990).
9. Ruggiero, L., Connor, M.P., Chen, J., Langen, R., & Finnemann, S.C. Diurnal, localized exposure of phosphatidylserine by rod outer segment tips in wild-type but not *Itgb5<sup>-/-</sup>* or *Mfge8<sup>-/-</sup>* mouse retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109** (21), 8145-8148, doi: 10.1073/pnas, (2012).
10. Finnemann, S.C., Bonilha, V.L., Marmorstein, A.D., & Rodriguez-Boulan, E. Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires alphavbeta5 integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94** (24), 12932-12937, (1997).
11. Lin, H., & Clegg, D.O. Integrin alphavbeta5 participates in the binding of photoreceptor rod outer segments during phagocytosis by cultured human retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39** (9), 1703-1712, (1998).
12. Nandrot, E.F., Anand, M., Almeida, D., Atabai, K., Sheppard, D., & Finnemann, S.C. Essential role for MFG-E8 as ligand for alphavbeta5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104** (29), 12005-12010, (2007).

13. Feng, W., Yasumura, D., Matthes, M.T., LaVail, M.M., & Vollrath, D. MerTK triggers uptake of photoreceptor outer segments during phagocytosis by cultured retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **277** (19), 17016-17022, (2002).
14. Finnemann, S.C. Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* **22** (16), 4143-4154, (2003).
15. Nandrot, E.F., Silva, K.E., Scelfo, C., & Finnemann, S.C. Retinal pigment epithelial cells use a MerTK-dependent mechanism to limit the phagocytic particle binding activity of  $\alpha\beta 5$  integrin. *Biol. Cell.* **104** (6), 326-341, doi: 10.1111/boc.201100076, (2012).
16. Ryeom, S.W., Sparrow, J.R., & Silverstein, R.L. CD36 participates in the phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelium. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 2), 387-395 (1996).
17. Finnemann, S.C., & Silverstein, R.L. Differential roles of CD36 and  $\alpha\text{v}\beta 5$  integrin in photoreceptor phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *J. Exp. Med.* **194** (9), 1289-1298, (2001).
18. Sun, M., et al. Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *J. Biol. Chem.* **281** (7), 4222-4230, (2006).
19. Law, A.L., et al. Annexin A2 regulates phagocytosis of photoreceptor outer segments in the mouse retina. *Mol. Biol. Cell.* **20** (17), 3896-3904, doi: 10.1091/mbc.E08-12-1204, (2009).
20. Strick, D.J., Feng, W., & Vollrath, D. MerTK drives myosin II redistribution during retinal pigment epithelial phagocytosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50** (5), 2427-2435, doi: 10.1167/iovs.08-3058, (2009).
21. Gibbs, D., Kitamoto, J., & Williams, D.S. Abnormal phagocytosis by retinal pigmented epithelium that lacks myosin VIIa, the Usher syndrome 1B protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100** (11), 6481-6486, (2003).
22. Gibbs, D., Diemer, T., Khanobdee, K., Hu, J., Bok, D., & Williams, D.S. Function of MYO7A in the human RPE and the validity of shaker1 mice as a model for Usher syndrome 1B. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **51** (2), 1130-1135, doi: 10.1167/iovs.09-4032, (2010).
23. Kennedy, C.J., Rakoczy, P.E., & Constable, I.J. Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review. *Eye (Lond.)* **9** (Pt 6), 763-771, (1995).
24. Finnemann, S.C., Leung, L.W., & Rodriguez-Boulán, E. The lipofuscin component A2E selectively inhibits phagolysosomal degradation of photoreceptor phospholipid by the retinal pigment epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99** (6), 3842-3847, (2002).
25. Sugano, E., Tomita, H., Ishiguro, S., Isago, H., & Tamai, M. Nitric oxide-induced accumulation of lipofuscin-like materials is caused by inhibition of cathepsin S. *Curr. Eye Res.* **31** (7-8), 607-616, (2006).
26. Vives-Bauza, C., et al. The age lipid A2E and mitochondrial dysfunction synergistically impair phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **283** (36), 24770-24780, doi: 10.1074/jbc.M800706200, (2008).
27. Singh, R., et al. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54** (10), 6767-6778, doi: 10.1167/iovs.13-11943, (2013).
28. Lei, L., Tzekov, R., McDowell, J.H., Smith, W.C., Tang, S., & Kaushal, S. Formation of lipofuscin-like material in the RPE Cell by different components of rod outer segments. *Exp. Eye Res.* **112**, 57-67, doi: 10.1016/j.exer.2013.04.006, (2013).
29. Carr, A.J., et al. Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One.* **4** (12), e8152, doi: 10.1371/journal.pone.0008152, (2009).
30. Lustremant, C., et al. Human induced pluripotent stem cells reveal early developmental molecular correlates with a probable Leber congenital amaurosis type I. *Cell. Reprogram.* **15** (3), 233-246, (2013).
31. Molday, R.S., Hicks, D., & Molday, L. Peripherin. A rim-specific membrane protein of rod outer segment discs. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28** (1), 50-61, (1987).
32. Chaitin, M.H., & Hall, M.O. Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **24** (7), 812-820, (1983).
33. Tsang, S.H., et al. Role for the target enzyme in deactivation of photoreceptor G protein *in vivo*. *Science.* **282** (5386), 117-121, (1998).
34. Carr, A.J., et al. Molecular characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay. *Mol. Vis.* **15**, 283-295, (2009).
35. Dun, Y., Vargas, J., Brot, N., & Finnemann, S.C. Independent roles of methionine sulfoxide reductase A in mitochondrial ATP synthesis and as antioxidant in retinal pigment epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 1340-1351, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.10.006, (2013).
36. Xu, Y.T., Wang, Y., Chen, P., & Xu, H.F. Age-related maculopathy susceptibility 2 participates in the phagocytosis functions of the retinal pigment epithelium. *Int. J. Ophthalmol.* **5** (2), 125-132, doi: 10.3980/j.issn.2222-3959.2012.02.02, (2012).
37. Mao, Y., & Finnemann, S.C. Essential diurnal Rac1 activation during retinal phagocytosis requires  $\alpha\beta 5$  integrin but not tyrosine kinases focal adhesion kinase or Mer tyrosine kinase. *Mol. Biol. Cell.* **23** (6), 1104-1114, doi: 10.1091/mbc.E11-10-0840, (2012).
38. Mao, Y., & Finnemann, S.C. Analysis of photoreceptor outer segment phagocytosis by RPE cells in culture. *Methods Mol. Biol.* **935**, 285-295, doi: 10.1007/978-1-62703-080-9\_20, (2013).
39. Mazzoni, F., Safa, H., & Finnemann, S.C. Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: Use and utility of RPE cells in culture. *Exp. Eye Res.* in press, (2014).
40. Hall, M.O., & Abrams, T. Kinetic studies of rod outer segment binding and ingestion by cultured rat RPE cells. *Exp. Eye Res.* **45** (6), 907-922, (1987).
41. Bulloj, A., Duan, W., & Finnemann, S.C. PI 3-kinase independent role for AKT in F-actin regulation during outer segment phagocytosis by RPE cells. *Exp. Eye Res.* **113**, 9-18, doi: 10.1016/j.exer.2013.05.002, (2013).
42. Chowers, I., et al. Changes in retinal pigment epithelial gene expression induced by rod outer segment uptake. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45** (7), 2098-2106, (2004).
43. Edwards, R.B., & Szamier, R.B. Defective phagocytosis of isolated rod outer segments by RCS rat retinal pigment epithelium in culture. *Science.* **197** (4307), 1001-1003, (1977).
44. Philp, N.J., & Bernstein, M.H. Phagocytosis by retinal pigment epithelium explants in culture. *Exp. Eye Res.* **33** (1), 47-53, (1981).
45. Burstyn-Cohen, T., Lew, E.D., Través, P.G., Burrola, P.G., Hash, J.C., & Lemke, G. Genetic dissection of TAM receptor-ligand interaction in retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Neuron.* **76** (6), 1123-1132, (2012).